

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

|   |  |
|---|--|
| Date of mailing:<br>08 March 2001 (08.03.01)          |  |
| International application No.:<br>PCT/JP00/04102      | Applicant's or agent's file reference:<br>JA903279 |
| International filing date:<br>22 June 2000 (22.06.00) | Priority date:<br>30 August 1999 (30.08.99)        |
| Applicant:<br>SAKANAKA, Masahiro et al                |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
13 November 2000 (13.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |   |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer:<br><br>J. Zahra<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|



(Received on 20 April 2001)

WRITTEN AMENMENT

(Amendment under the Provision of Article 11 in JAPAN,  
that is, Amendment under Article 34 of the PCT)

To: Mr. Hidenori Tsurumi, the Examiner of the JPO

1. Indication of International Application: PCT/JP00/04102

2. Applicant:

|             |  |
|-------------|--|
| Name        | Japan Science and Technology Corporation                         |
| Address     | 1-8, Honcho 4-chome,<br>Kawaguchi-shi, Saitama<br>332-0012 JAPAN |
| Nationality | JAPAN  |
| Address     | JAPAN  |

3. Representative:

|         |   |
|---------|---|
| Name    | Norio Saeki, Patent Attorney<br>(Reg.No.10266)  |
| Address | 9th Floor, Taka-ai Building,<br>15-2 Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo<br>103-0027 JAPAN |

4. Object to be Amended:

Claims and Drawing

5. Content of the Amendment:

(1) In claim 2 of page 150, "in which the extracellular fluid concentrations of the said composition(s) in lesioned tissues are adjusted to 14.5 ng/ml or less" is added at the beginning and in claim 2 of page 150, "cells" is amended to read "brain cells, nerve cells, neural stem cells, glial cells, vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells, hepatocytes liver cells, Kupffer's cells, sinusoid endothelial cells,

[illegible]

—

fibroblasts, biliary epithelial cells, lipocytes, lymphocytes, leukocytes, reticulum cells, macrophages or plasma cells,".

(2) Claim 8 of page 150 is cancelled.

(3) In claim 9 of page 150, "according to claim 2" is added at the beginning.

(4) Claim 16 of page 151 is cancelled.

(5) In claim 17 of page 151, "claim 35" is amended to read "any one of claims 12-15".

(6) In claim 18 of page 151, "in which the extracellular fluid concentrations of the said composition(s) in lesions are adjusted to 14.5 ng/ml or less" is added at the beginning and in claim 18 of page 151, "brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(7) Claim 22 of page 151 is cancelled.

(8) In the claim 23 of page 152, "claim 22" is amended to read "any one of claims 18-21".

(9) Claim 26 of page 152 is cancelled.

(10) In claim 27 of page 152, "claim 26" is amended to read "any one of claims 18-25".

(11) In claim 28 of page 152, "claim 26 or" is deleted.

(12) In claim 29 of page 152, "claim 26 or" is deleted.

(13) In claim 30 of page 152, "claim 26 or" is deleted.

(14) In claim 31 of page 152, "the brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(15) In claim 32 of page 152, "the brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(16) In claim 34 of page 152, "the brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(17) In claim 36 of page 152, "the brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(18) In claim 37 of page 153, "the brain and nervous diseases"



is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues".

(19) In claim 38 of page 153, "cerebral apoplexy, cerebral infarction" is deleted.

(20) In claim 39 of page 153, "the brain and nervous diseases" is amended to read "diseases caused by injuries to the nervous tissues or spinal cord tissues" and in claim 39 of page 153, "head injuries," is amended to read "head injuries or" and in claim 39 of page 153, "cerebrovascular dementia, cerebral infarction, cerebral apoplexy or transient cerebral ischemic attack" is deleted.

(21) In claim 40 of page 153, "in which the extracellular fluid concentrations of the said composition(s) in lesioned tissues are adjusted to 14.5 ng/ml or less" is added at the beginning.

(22) Claim 43 of page 153 is cancelled.

(23) In claim 44 of page 153, "according claim 43" is deleted.

(24) In claim 47 of page 153, "claim 43" is amended to read "claim 44".

(25) In claim 49 of page 154, "claim 43" is amended to read "claim 44".

(26) In claim 51 of page 154, "claim 43" is amended to read "claim 44".

(27) In claim 52 of page 154, "claim 43" is amended to read claim 44".

(28) In chemical structure 8 in Fig. 20, "OAc" is amended to read "OH".

6. List of the Document Attached:

Claims of page 150-154

Drawing of page 24/33

\*Since the translation is made in accordance with the Japanese Amendment, the page numbers do not apply to the English document.



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/15717 A1

(51) 国際特許分類: A61K 35/78, 31/704, C07J 17/00,  
A61P 9/08, 25/00, 43/00, G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04102

(22) 国際出願日: 2000年6月22日 (22.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/243378 1999年8月30日 (30.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本  
町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阪中雅広  
(SAKANAKA, Masahiro) [JP/JP]; 〒791-0204 愛媛

県温泉郡重信町大字志津川1191番地13 Ehime (JP).  
前田信治 (MAEDA, Nobuji) [JP/JP]; 〒790-0903 愛  
媛県松山市東野5丁目甲911-69 Ehime (JP). 田中潤  
也 (TANAKA, Junya) [JP/JP]; 〒791-0203 愛媛県温  
泉郡重信町大字横河原355-31 Ehime (JP). 仲田公彦  
(NAKATA, Kimihiko) [JP/JP]; 〒799-3111 愛媛県伊予  
市下吾川853 Ehime (JP).

(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都  
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BRAIN CELL OR NERVE CELL PROTECTING AGENTS COMPRISING GINSENG

(54) 発明の名称: 薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤

(57) Abstract: Medicinal compositions and preparations for administration comprising ginseng, which is useful as a cell protecting agent and a remedy for nerve trauma, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof (for example, red ginseng powder or components thereof). More particularly, medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death, medicinal compositions for promoting the expression of a cell death inhibitory gene product Bcl-XL, or preparations for oral or intravenous administration which comprise ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof preferably at a low concentration. These medicinal compositions and preparations for administration are characterized by containing as the active ingredient ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof at a low concentration. These drugs are useful in treating, preventing or managing brain and nerve diseases, heart diseases, etc.

[続葉有]

WO 01/15717 A1



---

(57) 要約:

本発明は、細胞保護剤、神経外傷治療剤として有用な薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、例えばコウジン末もしくはその成分からなる医薬組成物、投与用製剤を提供する。より詳細には、好ましくは低濃度の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物またはそれらの塩からなる、アポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物又は細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進させるための医薬組成物、又は、経口投与用製剤または静脈投与用製剤を提供するものである。本発明の医薬組成物、投与用製剤は、低濃度の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするものである。

本発明の薬剤は、特に脳・神経疾患、心臓疾患などの治療、予防又は処置のために有用である。

## 明 細 書

## 薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤

技術分野

本発明は、細胞保護剤などとして有用な薬用人参若しくはそのエキス又は薬用人参成分若しくはそれらの代謝産物に関する。より詳細には、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、アポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞保護のための医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脳浮腫、脳神経組織の浮腫、もしくは脊髄組織の浮腫を予防、治療、処置するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脊髄損傷に伴う褥創を予防、治療、処置するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織の細胞死抑制遺伝子 Bcl-xL 発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの保護剤、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物、に関する。

さらに、本発明は、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤、より詳細には、低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤に関する。

また、本発明は、前記疾患や病変の予防、処置又は治療のための有効成分、又は脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参成分又はその代謝産物の使用に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として作成できる新規化学的誘導体、すなわち細胞保護剤として有用なジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>にも関する。さらに、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための医薬組成物もしくは神経細胞の壊死（ネクロシス）、アポトーシス又はアポトーシス様神経細胞死を抑止するための医薬組成物に関する。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物、すなわち低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤もしくは単回静脈内注入製剤である医薬組成物に関する。

### 背景技術

脳卒中や神経変性疾患等の難治性神経疾患においては、共通して脳細胞又は神経細胞が死に至り、その結果非可逆的な高次神経機能障害がもたらされる。ひとたび、このような機能障害が生じると、その改善・治療・処置は困難を極め患者のQOL（quality of life、生活の質）が長年にわたって著しく損なわれる。従って、脳細胞又は神経細胞が死に至る前に、これらの細胞を有効に保護する優れた経口投与製剤が是非必要になるわけであるが、目下の所そのような医薬組成物は発明されていない。

さて、薬用人参の中でもコウジン末（紅参末）は漢方処方において頻繁に使用され、循環改善作用や自律神経－内分泌系の賦活作用など、多彩な薬効を有する生薬の1つとして位置付けられている。慢性期脳血管障害患者に対しても、コウジン末を経口投与することにより、患肢の冷感・しびれ感が改善し、深部皮膚温が上昇することが報告されている。この効果は主として、コウジン末の循環改善作用に起因するものと考えられている（山口武典、脳血管障害後遺症に対する薬用人参の効果、薬用人参'95、pp6-18、熊谷 朗編、共立出版）。しかしながら、コウジン末を慢性期脳血管障害患者（慢性期脳卒中患者）に経口投与しても、

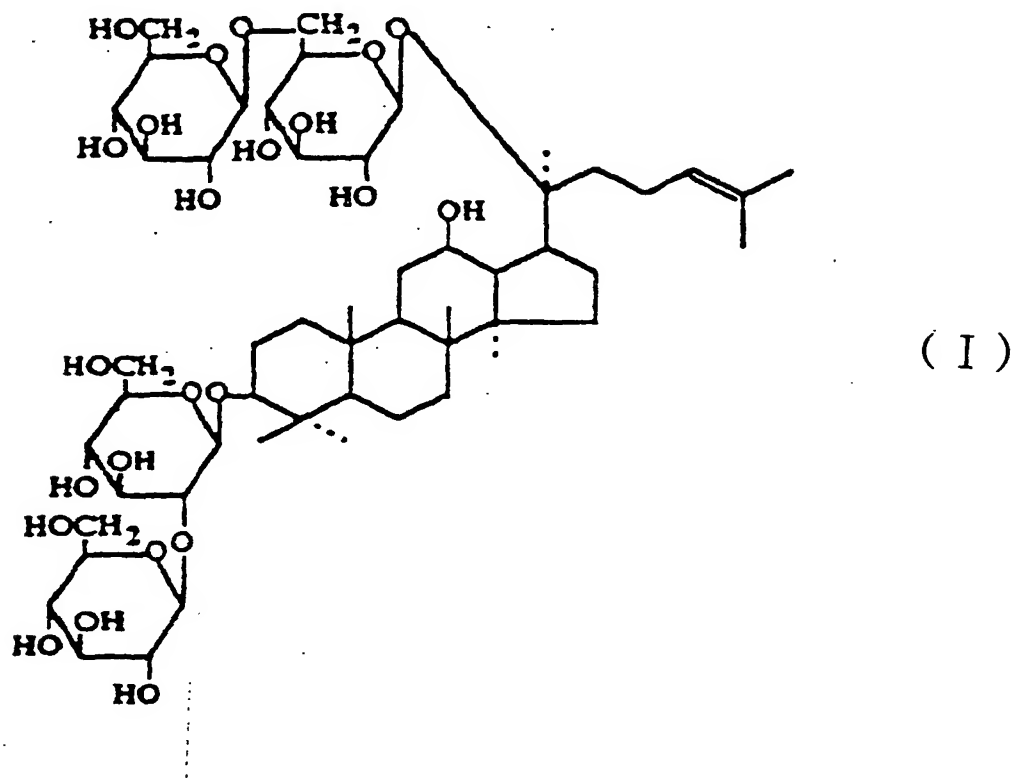
脳卒中病巣そのものが改善するという報告はみられない。また、コウジン末が急性期脳血管障害（急性期脳卒中）の予防・治療・処置のために一般臨床の場で使用されているという事実も見当たらない。さらにコウジン末が、神経細胞死を伴うその他の神経変性疾患、頭部外傷、脊髄損傷等に臨床の現場で使用されうるといふ実験医学的根拠もまったく存在しない。

本発明者の一人（阪中）は、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する前に、コウジン末を0.9 g/kg/日または1.5 g/kg/日の用量で1日単回7日間経口投与しておく、と、脳虚血後の学習行動障害が有意に改善され海馬CA1領域の神経細胞死も有意に予防されることを証明した（Wen et al., *Acta Neuropathol.* 91, 15-22, 1996）。ちなみに、一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミは、ヒトの一過性脳虚血発作のモデルと考えられている。しかし、5分間の一過性前脳虚血後に1週間コウジン末を同様の用量で経口投与しても、スナネズミ海馬CA1領域の神経細胞死は抑止されなかった。コウジン末の経口投与による神経細胞保護効果は、それほど強力ではなく、コウジン末を一過性脳虚血発作よりもはるかに重篤な脳梗塞患者すなわち脳血管が永久に閉塞した脳梗塞患者に応用するには無理があると考えられていた。しかも、コウジン末の経口投与がどのようなメカニズムで海馬CA1領域の遅発性神経細胞死を抑止するののかも明らかにされていない。もし、この作用メカニズムが解明されればコウジン末の新たな効果・効能が発明されるものと期待される。

さて、元来脳卒中（脳血管障害）の治療法は、脳梗塞・脳塞栓・脳出血・一過性脳虚血発作・クモ膜下出血で異なっており、厳密には脳のCT検査を実施しなければ有効な対策が立てられないのが現状である。たとえば血栓溶解剤などは脳梗塞・脳塞栓のみ使用され、脳出血には禁忌とされている。しかし、脳卒中は可及的すみやかに病巣部位の神経細胞を保護する処置がとられなければ、以後永久に高次機能障害をもたらすかあるいは生命予後に影響を与える重篤な疾患であるので、一刻も早く治療を開始すべき疾患である。極論を言えば、脳のCT検査を実施している時間すら、脳卒中患者にとって回復する可能性を少なくする要因になるのである。まさに急性期脳卒中の治療は、脳卒中病変のみならず発症後の時間との戦いと言っても過言ではない。ただ残念ながら、目下の所、脳卒中の病型

(脳梗塞・脳出血・脳塞栓・クモ膜下出血・一過性脳虚血発作)の如何を問わず、脳卒中を発症したと思われる患者に速やかに投与し、著効を示す薬物がほとんど存在しないのが実情である。

一方、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、下記構造式(I)



で示される化合物であり、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>は柴田ら (Shibata S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) などにより公知の物質である。

ジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、向神経作用としてその腹腔内投与によりこれまで静穏作用のみが報告されてきたが (Yoshimura H. et al., Eur. J. Pharmacol., 146, 291-297, 1988)、その作用機序についてはまったく解明されていない。また、中枢神経系においては、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>とジンセノサイドR<sub>g1</sub>の混合物あるいは $10^{-6}$ Mから $10^{-7}$ Mという極めて高濃度のジンセノサイドR<sub>g1</sub>又はジンセノサイドR<sub>b1</sub>がアセチルコリン含有神経細胞からのアセチルコリン遊離を活性

化し、アルツハイマー病に効能を示す可能性があることが報告されているが（米国特許：U S、 A、 5, 137, 878: Composition and method for treatment of senile dementia）、アセチルコリン細胞の機能障害がアルツハイマー病の主要所見であるとは言い難いので、この仮説には解決すべき問題が山積みしている。また、前記の米国特許文献は、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> がアセチルコリン含有神経細胞の生存を延長するか否か、すなわちアセチルコリン細胞を保護するか否かという課題には言及していない。

しかも、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> 単独の神経細胞保護作用については、本発明者らがジンセノサイド R b<sub>1</sub> の研究を手掛けるまではほとんど解明されていなかった。本発明者らはこれまで ジンセノサイド R b<sub>1</sub> がアセチルコリン含有神経細胞以外にも保護効果を発揮するかどうかを、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べてきた。この脳虚血モデル動物では、脳温を 37℃ に維持した状態で 3 分から 5 分間、総頸動脈血流を遮断すると、血流遮断時間に応じて虚血後一週間以内に海馬 C A 1 錐体神経細胞（アセチルコリン非含有）が変性脱落し（これを遅発性神経細胞死という）、同動物の学習行動機能も低下することが証明されている（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）。すなわち、スナネズミの一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作の病態を反映すると言える。

本発明者の一人（阪中）は、スナネズミの腹腔内にあらかじめジンセノサイド R b<sub>1</sub>（10 mg/kg または 20 mg/kg）を 1 日単回 1 週間注入しておくと、5 分間の総頸動脈血流遮断による遅発性神経細胞死と学習行動障害が有意に軽減されることを証明した（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）。しかしながら、5 分間あるいは 3 分間の総頸動脈血流遮断直後に、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> を腹腔内に注入しても効果はみられなかった（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996 ; Lim J.-H. et al., Neurosci., Res., 28, 191-200, 1997）、従って、この時点で末梢（腹腔内）投与されたジンセノサイド R b<sub>1</sub> の脳内移行率及び移行速度は非常に低いことが予想されたため、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> は海馬 C A 1 錐体神経細胞の保護という観点からは、臨床応用の可能性は皆無と考えられた。

前記のような末梢（腹腔内）投与に代えて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を3分間あるいは3.5分間の総頸動脈血流遮断の直後に、直接脳室内の持続注入すると遅発性神経細胞死と学習行動障害が抑止されることを本発明者の一人（阪中）が報告している（Lim J.-H. et al., *Neurosci., Res.*, 28, 191-200, 1997）。さらに、脳卒中易発症高血圧自然発症（SH-S P）ラットの中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞モデル（脳梗塞ラット）においても、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後より脳室内へ持続注入すると、大脳皮質梗塞巣が有意に縮小し、同動物の場所学習障害も軽減されることを発明者ら（阪中、田中、前田）が証明した（Zhang B. et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 7, 1-9, 1998）。

しかしながら、他のペプチド性成長因子と同様に（Sakanaka M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4635-4640, 1998; Wen T.-C. et al., *J. Exp. Med.*, 188, 635-649, 1998）、たとえジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脳室内直接投与で効果を示しても投与経路の問題からやはりヒトの一過性前脳虚血発作や脳梗塞症例にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を応用することは不可能と考えられた。

さて、脳梗塞の治療・予防・処置のため使用しうる化合物を検索する目的で、近年スナネズミやラットの脳虚血再灌流モデルを用いて、脳梗塞の予防・治療・処置のための候補物質をスクリーニングするという方法がしばしば採用されている。しかし、ここで注意すべきことは、スナネズミやラットの脳虚血再灌流障害モデルは、後述のごとく、ヒトの脳梗塞の病態を必ずしも反映しないということである。先述のごとく、本発明者の一人（阪中）はすでにスナネズミの脳虚血再灌流モデルを用いて、脳虚血負荷前にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を10mg/kg/日もしくは20mg/kg/日の用量で腹腔内投与しておく、海馬CA1領域の神経細胞のうち30%程度が救済されることを報告している。（Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996）。また、Zhang Y. G.とLiu T.P.は、10～40mg/kgの用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>をラットの中大脳動脈虚血再灌流モデルに単回静脈内投与すると、虚血前投与で梗塞サイズが対照群に比べて20%～49%程度縮小し、再灌流直後の投与で梗塞サイズが対照群に比べて12%～35%程度縮小することを報告している（Zhang Y.G. and Liu T.P., *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 中国薬理学報, 17, 44-48, 1996）。しかしながら、

この効果は、これまでに開発された脳虚血再灌流治療薬の候補物質（たとえば、グルタミン酸拮抗薬やフリーラジカル消去剤）の効果と比べて必ずしも優れているとは言えず、むしろかなり見劣りするものであった。（Slusher B.S. et al., Nature Med. 5, 1396-1402, 1999）。しかも、前述のZhang Y. G.とLiu T.P.の論文で、脳虚血再灌流障害の予防・治療に比較的良好な効果・効能を示した40 mg/kgというジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与量は、静脈内投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>のLD<sub>50</sub>が448 mg/kg前後であることを考慮すると（Saito H., et al., Shoyakugaku Zasshi, 生薬学雑誌 34, 177-181, 1980）、単回静脈内投与するだけでも副作用が出現する可能性も否定できないほど高用量であると言える。このような高用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は単回投与が限度であり、連日静脈内投与や静脈内への持続注入はまず困難と考えられる。

また、実際のヒト脳梗塞（脳血栓、脳塞栓）症例では、閉塞した脳血管近傍にカテーテルを挿入したのちに血栓溶解療法を実施して血管を再開通せしめた一部の症例を除いては、脳血管が永久に閉塞する 경우가非常に多いと考えられる。すなわち、真に有用な脳梗塞治療薬は、脳血管の一部（たとえば中大脳動脈）が永久閉塞したのちに静脈内投与可能で、かつ脳梗塞（脳血栓、脳塞栓）病巣がほぼ安定期にはいる発症後1ヶ月の時期まで、すなわちひとたび破綻した脳血管網が再生・再構築するまで、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）領域の脳細胞や神経細胞を確実に保護する薬物が必要と考えられる。すなわち、脳梗塞治療薬の候補物質の薬効解析は脳血管が永久に閉塞した動物を用いてなされるべきものであると考えられる。しかるに、Zhang Y. G.とLiu T.P.の前掲の論文によると、中大脳動脈を永久閉塞する前に、ラットにジンセノサイドRb<sub>1</sub>を10 mg/kgの用量で静脈内投与してもまったく効果はみられず、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を40 mg/kgの用量で中大脳動脈永久閉塞前に静脈内投与したときのみ梗塞サイズが対照群に比べて約14%程度縮小したと記述されている。すなわち、中大脳動脈を永久閉塞したラットに高用量（40 mg/kg）のジンセノサイドRb<sub>1</sub>をあらかじめ単回静脈内投与しておいても、中大脳動脈虚血再灌流ラットにジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与した場合と比較して、明らかに効果が弱いと考えられた。しかも、中大脳動脈を永久閉塞されたラットに対して脳梗塞前投与で多少なりとも効

果を示すジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与量が40mg/kgという高用量なので、やはり静脈内投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>のLD<sub>50</sub>が448mg/kg前後であることを勘案すると、このような高用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を連日もしくは持続的に静脈内投与することは不可能と考えられた。本発明者らの経験によれば、脳血管の一部（たとえば中大脳動脈）が永久閉塞した実験動物に1回ないし2回程度脳梗塞治療薬の候補物質を静脈内投与して脳梗塞発症後1～2日程度は効果がみられても、その後同候補物質が持続的に投与されなければ脳梗塞病変は確実に拡大し脳血管永久閉塞後1ヶ月（すなわち脳梗塞病変がほぼ安定期に入る頃）には、ほぼ効果がみられなくなると考えられる。すなわち、脳梗塞治療薬の重要な条件として、長期静脈内投与もしくは連日静脈内投与可能な化合物であることがあげられる。しかしながら、Zhang Y. G.とLiu T. P.が発表した前述の論文からも判断するかぎり、高用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与を脳梗塞や脳卒中の治療・予防・処置に応用することは事実上不可能と考えられた。

さて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳梗塞の治療・予防・処置のために実用化することはほぼ不可能であるという従来の考え方を覆すような発明が、その後本発明者ら（阪中、田中）によりなされた。その詳細については、特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに特願平11-340850号、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）に記述されている。すなわち、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SH-SPラット）の中大脳動脈皮質枝（MCA）を永久閉塞したのちに、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を60μg/日もしくは6μg/日の用量で28日間静脈内へ持続注入すると、脳梗塞（脳塞栓）病巣体積が生理食塩水（vehicle、媒体）注入脳梗塞群の約4分の1程度に縮小することを本発明者ら（阪中、田中）は前述の既出願特許において見出した。すなわち、MCAを永久閉塞したのちに低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内へ持続投与することにより、脳梗塞病巣体積が対照群に比べて75%程度縮小したことになる。しかも、このように少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を28日間静脈内へ持続注入することにより、MCA永久閉塞後ひとたび破綻した脳血管が再生・再構築し、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈

内投与を以後中止しても、もはや脳梗塞病変は悪化しないことが見出された。本発明者ら（阪中、田中）が用いたSH-SPLラットの体重は約300gであるので、1日あたりのジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与量は200 $\mu$ g/kgもしくは20 $\mu$ g/kgということになる。従って、Zhang Y. G. and Liu T.P.の論文（Chung Kuo Yao Li Hsuech Pao, 中国薬理学報, 17, 44-48, 1996）にて用いられた40mg/kgのジンセノサイドRb<sub>1</sub>単回静脈内投与と比較して、SH-SPLラットへの1日あたりの投与量はその200分の1もしくは2000分の1ということになる。すなわち、特願平10-365560号、PCT/JP/02550、特願平11-340850、PCT/JP99/06804において、本発明者ら（阪中、田中）は、少量（低用量）のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の長期間静脈内持続投与という極めて優れた脳梗塞（脳血栓、脳塞栓）、脳卒中、脳血管障害の治療法を発明したことになる。もちろん、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳卒中発症後、連日静脈内への単回注入を実施することもできるし、連日点滴用組成物に少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を混入した上で静脈内へ一定時間をかけて投与することも可能である。さらに、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳室内投与や腹腔内投与が虚血神経組織の二次変性を抑止するという本発明者らの既発表論文（Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）に加えて、前述の既出願特許において、本発明者ら（阪中、田中）は、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が神経組織の二次変性を極めて効果的に抑止することを見出した。また、前述の既出願特許において、本発明者ら（阪中、田中）は、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が神経外傷、頭部外傷、脊髄損傷の予防・治療・処置にも利用できることを見出した。

ところで、脳卒中、神経外傷、頭部外傷、脊髄損傷、頭蓋内出血、心停止、低酸素脳症、脳炎等の病態において、脳神経組織に大きな侵襲が加わると、脳浮腫が出現し、その結果脳圧が著しく亢進して生命を脅かすことがしばしばある。臨床現場では、この脳浮腫・脳圧亢進に伴う脳組織のヘルニアを予防・治療・処置するために、マニトール、グリセロール、ステロイド剤がしばしば使用されるが、投薬を中止した後のリバウンド現象や副作用の問題を必ずしも克服しきれていない。従って、安全かつ長期的に投与可能な脳浮腫の治療薬が将来是非必要になる

と考えられるが、目下の所そのような医薬組成物は見当たらない。

また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の末梢（腹腔内）投与による神経細胞保護作用のメカニズムについて、本発明者らはこれまでに低濃度（0.1～100fg/ml）の同薬物をあらかじめ培養液に混入しておく、ヒドロキシルラジカル誘発剤（硫酸第一鉄）による神経細胞の壊死（ネクローシス）が軽減されることを報告している（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がヒドロキシルラジカルを消去することにより、細胞膜の過酸化脂質を減少せしめ、培養神経細胞を保護するものと推測してきたが、これまでにこの仮説を証明した報告はみられない。

また、高濃度（約0.11～11μg/ml）のジンセノサイドRb<sub>1</sub>がグルタミン酸の神経毒性を軽減して神経細胞死を予防すること（Kim Y.-C., et al., J. Neurosci. Res., 53, 426-432, 1998; Liu M. and Zhang JT., Acta Pharmaceutica Sinica, 30, 674-678, 1995）、あるいは500μM（550μg/ml）という高濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>がアポトーシス様神経細胞死を予防する可能性があること（田中知明ら、The Ginseng Review, 24, 61-65, 1998）が培養実験で報告されているが、高濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は本発明者らの培養実験によれば神経細胞死を抑止しないことが判明している（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

しかも、このように高濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を患部の生体組織内もしくは脳神経組織内の細胞外液で再現又は維持することは極めて困難であるのみならず、コスト面や副作用出現の可能性を考えても大量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を生体に投与することは不可能である。実際、これまでの本発明者らの実験結果からも、高用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は生体にとって必ずしも好ましい効果・効能をもたらさないことが判明している（Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>による神経細胞保護作用のメカニズムはこれまでに十分に解明されていないというのが現状であった。

そこで、特願平 10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、本発明者ら（阪中、田中）は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> が 1 ng/ml 以下、好ましくは 1 fg/ml 前後から 100 fg/ml 前後という世界に類をみない低濃度域で、細胞死抑制遺伝子物産 Bcl-x<sub>L</sub> の発現増加を促し、アポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出した。すなわち、前述の既出願特許において、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は世界で唯一の非ペプチド性の Bcl-x<sub>L</sub> 発現増強剤であることが見出された。また、100 fg/ml の濃度ではわずかにジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の過酸化脂質生成抑制効果はみられたが、それよりも低い濃度域ではそのような効果はみられなかった。従って、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の作用機構に関する従来の仮説（すなわちジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は細胞膜脂質の過酸化を強力に抑止するという仮説）は必ずしも妥当ではないことが判明した。さらに、前述の既出願特許において、生体内でも、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> がアポトーシス様神経細胞死を抑止することが見出された。

ところで、Bcl-x<sub>L</sub> は神経細胞のみならず他の末梢組織の細胞やグリア細胞にも発現しているので、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> が神経細胞の Bcl-x<sub>L</sub> 発現を増強するという事実は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> がその他の細胞に対しても同様の作用を有することが推測される。中でも、心筋細胞は Bcl-x<sub>L</sub> を豊富に発現しているので、低濃度、低用量のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> が効果・効能を示す標的細胞として可能性が極めて高いということを、本発明者ら（阪中、田中）は既出願特許において記載している（特願平 10-365560、PCT/JP99/02550、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤；特願平 11-340850、PCT/JP99/06804（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤））。

また、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は薬用人参に含まれる精製サポニンの一種であるが、単独経口投与により血中ではまったく検出されないため事実上ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の経口投与自体の薬理作用は否定されてきた。従って、特願平 10-365560、PCT/JP99/20550（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに特願平 11-340850、PCT/JP99/06804（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組

織二次変性抑止剤)において、本発明者ら(阪中、田中)は少量静脈内投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>が薬用人蔘とは独立した効果・効能・用途をもつことが明らかにしたわけである。

さて、薬用人蔘の粗サポニン分画には、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>に加えてジンセノサイドRb<sub>1</sub>と化学構造が類似している精製サポニンが少なくとも30種類前後存在する(庄司、薬用人蔘'95、PP251-261、熊谷 郎編、共立出版株式会社)。当然のことながらこれらジンセノサイドRb<sub>1</sub>以外の精製サポニンも本発明者らの先の出願(特願平11-243378、薬用人蔘からなる脳細胞または神経細胞保護剤)に記載されたごとく、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与と同様の効果・効能を示すことが期待される。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を始めとする薬用人蔘成分をリード化合物として新規の有用な化合物を作成できることも本発明の先の出願(特願平11-243378)において記載している。

以上、薬用人蔘経口投与の作用メカニズム探究の必要性、少量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与の画期的効果、脳浮腫の予防・治療・処置剤の重要性、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>のBcl-x<sub>L</sub>発現増強作用、薬用人蔘の粗サポニン分画もしくはその成分の生理作用追究の必要性について言及しながら、従来の技術の概略を記述した。本発明では、まずコウジン末の経口投与が、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒト脳梗塞の病態に近い中大脳動脈皮質枝永久閉塞ラットにおいて、思いもよらぬ優れた脳梗塞抑止作用、脳浮腫改善効果、ならびに場所学習障害改善作用を示すことを見出した。また、コウジン末の経口投与が、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>蛋白質の神経組織における発現を増強することを見出した。さらに、少量もしくは低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が脳浮腫の出現を極めて効果的に抑止すること、0.01~10<sup>-4</sup>fg/mlもしくは1~10<sup>-4</sup>fg/mlの濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が心筋細胞のBcl-x<sub>L</sub>発現を増強し、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止すること、薬用人蔘(コウジン末)の粗サポニン分画の少量静脈内持続投与が、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与と同様の脊髄損傷治療効果を示すことを見出し、本発明を完成した。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の新規化学的誘導体すなわちジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が優れた脳梗塞治療効果を示すこと

を見出し、本発明を完成した。

### 発明の開示

本発明の目的は、優れた脳細胞又は神経細胞保護効果を示し、かつ細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現を促すことにより細胞を保護する薬物を提供することである。さらに本発明者は、脳浮腫、脳神経組織の浮腫、もしくは脊髄組織の浮腫を予防、治療、処置するための少量静脈内投与用製剤を提供すること、脊髄損傷に伴う褥創を予防、治療、処置するための低用量静脈内投与用製剤を提供すること、神経組織の細胞死抑制遺伝子 Bcl-2 の発現を促進させるための静脈内投与用製剤を提供すること、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 の発現を促進させるための医薬組成物を提供すること、オリゴデンドロサイトの保護剤を提供すること、心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 の発現を促進するための医薬組成物を提供すること、心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物を提供すること、を目的とする。また本発明の目的は、神経組織又は脊髄組織の損傷・外傷による疾患の予防、処置、又は治療用の静脈内投与用製剤を提供すること、ならびに神経組織又は脊髄組織又は脊髄組織の損傷・外傷によって惹起される脱髄、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死、神経組織の二次変性を抑止するための医薬組成物を提供することである。

本発明は、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための少量静脈内持続投与製剤を提供すること、ならびに神経細胞のアポトーシス又はアポトーシス様神経細胞死を抑止するための医薬組成物を提供すること、も目的とする。さらに本発明は、薬用人参含有成分もしくはそれらの代謝産物をリード化合物として利用することにより新規の有用な脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤が作成できることを実証することを目的とする。

本発明は、細胞保護剤として有用な薬用人参若しくはそのエキス又は薬用人参成分若しくはそれらの代謝産物の有効な経口投与用製剤を提供する。より詳細には、薬用人参若しくはそのエキス又は薬用人参成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、

薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物を提供するものである。また、本発明は薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる脳・神経疾患もしくは脳浮腫の治療、予防又は処置などのために有用な経口投与製剤を提供するものである。

さらに、本発明が提供するものは、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫を予防、治療、処置するための低用量の静脈内投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脊髄損傷に伴う褥創を予防、治療、処置するための静脈内持続投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、神経組織の細胞死抑制遺伝子 Bcl-2 発現を促進させるための静脈内投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 の発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイト保護剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 の発現を促進するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物、である。

また、本発明は薬用人蔘の粗サポニン分画またはその構成成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷・外傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を提供する。より詳細には、本発明は神経組織の損傷による神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用の医薬組成物、脊髄損傷、頭部外傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物、脱髄を伴う神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物、を提供する。また、本発明は、薬用人蔘の粗サポニン分画またはその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細

胞死を抑止させるための医薬組成物を提供する。本発明は、神経組織二次変性抑制剤として有用な、薬用人蔘の粗サポニン分画またはその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩をも提供する。

また、本発明は前記疾患や病変の予防、処置又は治療のための有効性分、又は脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘の成分又はその代謝産物の使用法を提供する。

さらに、本発明は薬用人蔘の成分物質の1つであるジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として作成できる新規ジンセノサイドRb<sub>1</sub>誘導体、すなわち細胞保護剤として有用なジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を提供する。より詳細には、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための医薬組成物、もしくは神経細胞のアポトーシス又はアポトーシス様神経細胞死を抑止するための医薬組成物を提供する。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物、すなわち低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤もしくは単回静脈内注入製剤である医薬組成物を提供する。

さて前述のごとく、本発明では薬用人蔘の経口投与実験、低用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与実験、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた培養実験、薬用人蔘の粗サポニン分画の少量静脈内持続投与実験、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の新規化学的誘導体すなわちジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与実験等に基づいて記述されているが、以下の記述では、先の出願（特願平11-243378号、薬用人蔘からなる脳細胞または神経細胞保護剤）において明らかにされた薬用人蔘の経口投与実験においてまず説明することとする。その後、粗サポニン分画の静脈内投与実験を交えながら、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与実験ならびに低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた培養実験について記述することにする。また、最後にジンセノサイドRb<sub>1</sub>の新規化学的誘導体ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた実験結果を説明する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、MCA永久閉塞前後に蒸留水又はコウジン末を経口投与されたラッ

トの水迷路テストの結果を示す図である。第1図の上側は2週目の結果であり、同下側は4週目の結果である。また第1図中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末0.6 g/kg/日投与虚血群、黒四角印はコウジン末0.75 g/kg/日投与虚血群、白三角印はコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群、黒三角印はコウジン末1.2 g/kg/日投与虚血群を示す。

第2図は、MCA永久閉塞前後に蒸留水又はコウジン末を経口投与された動物の脳皮質梗塞比率を示す図である。

第3図は、脳皮質梗塞巣の写真である。上段が蒸留水投与虚血群4例、下段がコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群4例である。

第4図は、実施例1の結果をまとめた模式図である。

第5図は、MCA永久閉塞後に蒸留水又はコウジン末を経口投与されたラットの水迷路テストの結果を示す図である。第5図の上段は2週目の結果であり、同下段は4週目の結果である。また第5図の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒四角印はコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群を示す。参考として、第1図で用いた偽手術群の実験値を黒丸印で示す。

第6図は、MCA永久閉塞後に蒸留水又はコウジン末0.9 g/kg/日を経口投与されたラットの脳皮質梗塞比率を示す。

第7図は、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する前に一週間1日単回コウジン末又は蒸留水を投与したときの、反応潜時と海馬CA1領域神経細胞密度を示す図である。上段(A)が受動的回避学習実験の反応潜時を、下段(B)が神経細胞密度を示す。偽手術群を白カラム、蒸留水投与虚血群を灰色カラム、コウジン末投与虚血群を黒カラム、で示す。

第8図は、偽手術動物、蒸留水経口投与虚血動物、コウジン末経口投与虚血動物(1.5 g/kg/日)の海馬CA1領域におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

第9図は、第8図のウエスタンブロッティングの結果をデンシトメトリーで定量化したグラフである。

第10図(A)は、蒸留水投与動物とコウジン末投与動物(200 mg/kg

／日)の肝臓におけるBcl-xL蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

第10図(B)は、第10図(A)のウエスタンブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

第11図(A)は、蒸留水投与動物とコウジン末投与動物(200mg/kg／日)の脾臓におけるBcl-xL蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

第11図(B)は、第11図(A)のウエスタンブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

第12図は、スナネズミに3分間の前脳虚血を負荷した後に、28日間1日単回コウジン末又は蒸留水を投与したときの、反応潜時と海馬CA1領域神経細胞密度を示す図である。上段(A)が受動的回避学習実験の反応潜時を、下段

(B)が神経細胞密度を示す。偽手術群を白カラム、蒸留水投与虚血群を灰色カラム、コウジン末投与虚血群を黒カラム、で示す。

第13図の(A)は偽手術動物、(B)は蒸留水投与3分虚血動物、(C)はコウジン末投与3分虚血動物の、海馬CA1領域光学顕微鏡像をそれぞれ示す。バーは100μmを示す。

第14図は、大脳皮質梗塞巣の写真である。上段が生理食塩水静脈内投与虚血群8例、下段がジンセノサイドRb<sub>1</sub>(6μg／日)静脈内投与虚血群8例である。

第15図は、薬用人蔘に含有される代表的サボニンの化学構造を示す。

第16図は、脊髄損傷当日と翌日の生理食塩水静脈内投与ラットならびにジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与ラット(60μg／日)を示す図面に代わる写真である。

第17図は、脊髄損傷後7日目における、生理食塩水静脈内投与ラット、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>(12μg／日、60μg／日)静脈内投与ラットのBBB score(スコア)を示す。

第18図は、脊髄損傷当日から7日目の粗サボニン分画(870μg／日)静脈内投与ラットを示す図面に代わる写真である。

第19図は、脊髄損傷当日から7日目の生理食塩水静脈内投与ラットを示す図

面に代わる写真である。

第20図は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の化学的誘導体を示す。

第21図は、脊髄損傷の2時間後から生理食塩水もしくはジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) を静脈内投与されたラットを示す図面に代わる写真である。また第21図は、脊髄損傷後生理食塩水を投与されたラットが褥創を生じることを示す図面に代わる写真でもある。さらに第21図は、脊髄損傷後ジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) を静脈内投与されたラットが褥創を生じないことを示す図面に代わる写真である。

第22図は、神経細胞とオリゴデンドロサイト共培養系に対するジンセノサイドRb<sub>1</sub>の細胞生存促進効果を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。1~100 fg/mlのジンセノサイドRb<sub>1</sub>処置により、神経細胞のマーカーであるMAP2とオリゴデンドロサイトのマーカーであるCNPaseが明らかに濃くなっている。すなわち、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>により神経細胞ならびにオリゴデンドロサイトの生存が促進されたといえる。

第23図上段のRT-PCR実験結果は、100 fg/mlのジンセノサイドRb<sub>1</sub>処置によりオリゴデンドロサイトのBcl-x<sub>L</sub> mRNAが増加することを示す、図面に代わる写真である。第23図下段のウエスタンブロット (イムノブロッティング) 実験結果は、1~100 fg/mlのジンセノサイドRb<sub>1</sub>処置によりオリゴデンドロサイトのBcl-x<sub>L</sub>蛋白が増加することを示す、図面に代わる写真である。

第24図のRT-PCR実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) を静脈内投与により脳組織におけるBcl-x<sub>L</sub> mRNA発現が上昇することを示す、図面に代わる写真である。

第25図の上段は、1~100 fg/mlの濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>により心筋細胞のBcl-x<sub>L</sub> mRNA発現が上昇することを示す、図面に代わるRT-PCRの写真である。第25図の中段は、1~10<sup>4</sup> fg/mlの濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>により心筋細胞のBcl-x<sub>L</sub>蛋白発現が上昇することを示す、図面に代わるイムノブロッティングの写真である。第25図の下段は、イムノブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

第26図の上段は、 $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$ の濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>処置により心筋細胞の生存が促進されることを示す、図面に代わる $\alpha$ -アクチニンのウエスタンブロッティングの写真である。第26図の下段は、ウエスタンブロッティング（イムノブロッティング）の結果をデンシトメトリーで定量化したグラフである。例数が $n=3$ とやや少ないので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>  $0.01 \text{ fg/ml}$ の濃度では有意差が得られていないが、例数を増やせばジンセノサイドRb<sub>1</sub>  $0.01 \text{ fg/ml}$ の濃度でも有意な心筋細胞保護効果が検出される可能性が高いと考えられる。

第27図は、MCA永久閉塞後（すなわち脳梗塞発症後）に生理食塩水を静脈内投与されたラット脳（2例）のTTC染色結果を示す、図面に代わる写真である。

第28図は、MCA永久閉塞後（すなわち脳梗塞発症後）にジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>（約 $6 \mu\text{g/日}$ ）を静脈内投与されたラット脳（2例）のTTC染色結果を示す、図面に代わる写真である。

第29図は、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>のNMRのチャートを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物に関する。好ましくは、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が、 $145 \text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5 \text{ ng/ml}$ 以下又は $1 \text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01 \sim 145000 \text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1 \sim 145000 \text{ fg/ml}$ となるように調整されている細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物に関する。

また、本発明は、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させることにより予防、治療又は処置することができる疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が $145 \text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは

0.01~145000fg/ml、さらに好ましくは1~145000fg/mlとなる量の、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させることにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物を製造するための、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させる組織としては、脳神経組織、脊髄組織、肝臓、脾臓などが挙げられ、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中などの脳・神経疾患の予防、治療又は処置に有用である。

本発明の細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物は、経口投与用製剤又は静脈内投与用製剤として使用することができる。

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含むこととなる細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑制用医薬組成物に関する。好ましくは、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が、145ng/ml以下、好ましくは14.5ng/ml以下又は1ng/ml以下、より好ましくは0.01~145000fg/ml、さらに好ましくは1~145000fg/mlとなるように調整されている細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑制用医薬組成物に関する。

また、本発明は、細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制することにより予防、治療又は処置することができる疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が145ng/ml以下、好ましくは14.5ng/ml以下又は1ng/ml以下、より好ましくは0.01~145000fg/ml、さらに好ましくは1~145000fg/mlとなる量の、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞

死を抑止ことにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物を製造するための、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の当該細胞としては、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞、形質細胞などが挙げられ、これらの細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす疾患の治療、予防、又は処置に有用である。

本発明の細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物は、経口投与用製剤又は静脈内投与用製剤として使用することができる。

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物に関する。好ましくは、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が、 $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim145000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim145000\text{ fg/ml}$ となるように調整されている脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物に関する。

また、本発明は、脳・神経疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim145000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim145000\text{ fg/ml}$ となる量の、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、脳・神経疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物を製造するための、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の前記脳・神経疾患としては、脊髄損傷などの神経組織又は脊髄組織の損傷；頭部外傷や神経外傷などの神経組織又は脊髄組織の外傷；オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患；脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、頭蓋内出血、脊髄損傷、又は神経外傷などによる脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫；脳血管性痴呆；脳梗塞；脳卒中；一過性脳虚血発作；神経組織又は脊髄組織の損傷又は外傷などによる上肢もしくは下肢の麻痺、排尿障害、自律神経障害、性機能障害もしくは排便障害、神経因性膀胱などが挙げられる。

本発明の脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物は、経口投与用製剤又は静脈内投与用製剤として使用することができる。

また、本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩からなる脳・神経疾患又は脳浮腫の治療、予防若しくは処置剤、又は脳細胞若しくは神経細胞保護剤に関する。

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物に関する。好ましくは、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が、 $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim145000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim145000\text{ fg/ml}$ となるように調整されている心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物に関する。

また、本発明は、心臓疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim145000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim145000\text{ fg/ml}$ となる量の、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、心臓疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物を製造するための、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代

謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の心臓疾患としては、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものが好ましい。

本発明の心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物は、経口投与用製剤又は静脈内投与用製剤として使用することができる。

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる静脈内投与用製剤に関する。より詳細には、脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中若しくは一過性脳虚血発作などの脳・神経疾患、又は心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴う心臓疾患などの心臓疾患の治療、予防又は処置のための静脈内投与用製剤に関する。好ましくは、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が、 $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim145000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim1450000\text{ fg/ml}$ となるように調整されている、低濃度の静脈内投与用製剤に関する。本発明の静脈内投与用製剤は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与製剤のいずれのものであってもよい。

したがって、本発明は、前記した本発明の静脈内投与用製剤からなる脳細胞、神経細胞又は心筋細胞の保護剤を提供する。

また、本発明は、脳・神経疾患及び／又は心臓疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が $145\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $14.5\text{ ng/ml}$ 以下又は $1\text{ ng/ml}$ 以下、より好ましくは $0.01\sim1450000\text{ fg/ml}$ 、さらに好ましくは $1\sim1450000\text{ fg/ml}$ となる量の、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤を投与することからなる、脳・神経疾患及び／又は心臓疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、脳・神経疾患及び／又は心臓疾患の治療、予防又は処置のための静脈内投与用製剤を製造するための、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となるように調整されている生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物に関する。

また、本発明は、生体組織の浮腫を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となる量の、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、生体組織の浮腫を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物を製造するための、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の生体組織の浮腫としては、脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、頭蓋内出血、脊髄損傷、神経外傷などによる脳浮腫、脳神経組織の浮腫又は脊髄組織の浮腫などが挙げられる。

本発明の生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる剤形の予防、処置又は治療用医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好まし

くは  $1 \text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9 \text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となるように調整されている褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物に関する。

また、本発明は、褥創の患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$  以下または約  $9 \text{ nM}$  以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9 \text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となる量の、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、褥創を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するための、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の褥創としては、脊髄損傷などによる褥創などが挙げられる。

本発明の褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$  以下または約  $9 \text{ nM}$  以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9 \text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となるように調整されている神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。

また、本発明は、神経麻痺の患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$  以下または約  $9 \text{ nM}$  以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9 \text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となる量の、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、神経麻痺を予防、治療又は処置する方法に関

する。

さらに、本発明は、神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物を製造するための、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の神経麻痺としては、脊髄損傷後の上肢または下肢の麻痺などが挙げられる。

本発明の神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となるように調整されている排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。

また、本発明は、排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となる量の、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物を製造するための、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の排尿障害、性機能障害、もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となるように調整されている神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物に関する。

また、本発明は、神経因性膀胱の患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となる量の、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、神経因性膀胱を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物を製造するための、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、10 ng/ml以下または約9 nM以下、好ましくは1 ng/ml以下または約0.9 nM以下、より好ましくは0.01~100 fg/ml（約0.009~90 fM）、さらに好ましくは1~10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9~9000 fM）となるように調整されているオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物に関する。

また、本発明は、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進させることにより予防、治療又は処置することができる疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、 $10\text{ ng/ml}$  以下または約  $9\text{ nM}$  以下、好ましくは  $1\text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9\text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01\sim100\text{ fg/ml}$  (約  $0.009\sim90\text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1\sim10^4\text{ fg/ml}$  (約  $0.9\sim9000\text{ fM}$ ) となる量の、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進させることにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進させるための医薬組成物を製造するための、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明は、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイト保護剤に関する。

本発明のオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進させるための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に関する。好ましくは、ジンセノサイド  $Rb_1$  もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、 $10\text{ ng/ml}$  以下または約  $9\text{ nM}$  以下、好ましくは  $1\text{ ng/ml}$  以下または約  $0.9\text{ nM}$  以下、より好ましくは  $0.01\sim100\text{ fg/ml}$  (約  $0.009\sim90\text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1\sim10^4\text{ fg/ml}$  (約  $0.9\sim9000\text{ fM}$ ) となるように調整されている心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に関する。

また、本発明は、心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止することにより予防、治療又は処置することができる疾患を有する患者に、有効量

の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $9 \text{ nM}$ 以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $0.9 \text{ nM}$ 以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となる量の、ジンセノサイド  $Rb_1$ 、もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止することにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物を製造するための、ジンセノサイド  $Rb_1$ 、もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、ジンセノサイド  $Rb_1$ 、もしくはその代謝産物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進するための医薬組成物。好ましくは、ジンセノサイド  $Rb_1$ 、もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $9 \text{ nM}$ 以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $0.9 \text{ nM}$ 以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となるように調整されている心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進するための医薬組成物に関する。

また、本発明は、心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を促進することにより予防、治療又は処置することができる疾患を有する患者に、有効量の、好ましくは患部組織における細胞外液濃度が、 $10 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $9 \text{ nM}$ 以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$ 以下または約  $0.9 \text{ nM}$ 以下、より好ましくは  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  (約  $0.009 \sim 90 \text{ fM}$ )、さらに好ましくは  $1 \sim 10^4 \text{ fg/ml}$  (約  $0.9 \sim 9000 \text{ fM}$ ) となる量の、ジンセノサイド  $Rb_1$ 、もしくはその代謝産物又はそれらの塩を投与することからなる、心筋細胞の

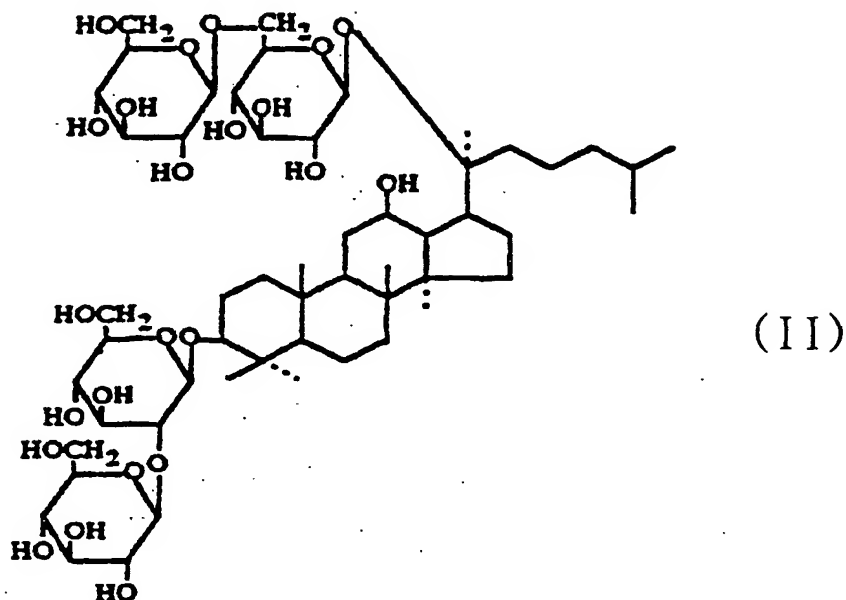
細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進することにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進するための医薬組成物を製造するための、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

また、本発明は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞保護剤に関する。

本発明の心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進するための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、下記構造式 (II)



で示されるジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩に関する。

本発明は、前記構造式 (II) で示されるジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくは代謝物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる細胞のアポト

ーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に関する。

また、本発明は、細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止することにより予防、治療又は処置することができる疾患疾患を有する患者に、有効量の前記構造式（II）で示されるジヒドロジンセノサイドR<sub>b</sub>、もしくは代謝物又はそれらの塩を投与することからなる、細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止することにより予防、治療又は処置することができる疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物を製造するための、前記構造式（II）で示されるジヒドロジンセノサイドR<sub>b</sub>、もしくは代謝物又はそれらの塩の使用に関する。

当該細胞としては、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の脳細胞又は神経細胞などが挙げられる。

本発明の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、前記構造式（II）で示されるジヒドロジンセノサイドR<sub>b</sub>、もしくは代謝物又はそれらの塩、及び製薬上許容される担体を含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物に関する。

また、本発明は、脳・神経疾患の患者に、有効量の前記構造式（II）で示されるジヒドロジンセノサイドR<sub>b</sub>、もしくは代謝物又はそれらの塩を投与することからなる、脳・神経疾患を予防、治療又は処置する方法に関する。

さらに、本発明は、脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物を製造するための、前記構造式（II）で示されるジヒドロジンセノサイドR<sub>b</sub>、もしくは代謝物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の前記脳・神経疾患としては、脊髄損傷などの神経組織又は脊髄組織の損傷；頭部外傷や神経外傷などの神経組織又は脊髄組織の外傷；オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患；脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、頭蓋内出血、脊髄損傷、又は神経外傷などによる脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫；脳血管性痴呆；脳梗塞

；脳卒中；一過性脳虚血発作；神経組織又は脊髄組織の損傷又は外傷などによる上肢もしくは下肢の麻痺、排尿障害、性機能障害もしくは排便障害、神経因性膀胱などが挙げられる。

本発明の脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物は、単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤などの静脈内投与用製剤が好ましい。

本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に関する。

本発明の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩としては、コウジン末又はその抽出物、薬用人蔘の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩などがあげられ、薬用人蔘のサポニン分画含有成分としてはジンセノサイドRb<sub>1</sub>が好ましい。また、前記の神経組織又は脊髄組織の疾患としては、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患もしくは脳梗塞などが挙げられる。

また、本発明は、これらのいずれかに記載の方法により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤に関する。

さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分、神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤、又は神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用に関する。

また、本発明は、薬用人蔘に含有される成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法又はその使用に関する。

本発明の「薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩」としては、後述する薬用人蔘そのもの；薬用人蔘の抽出物；当該抽出物からなるエキス；それらのいずれかを含有してなる製剤；粗サポニン分画、サポニン分画、精製サポニン分画などの薬用人蔘又はその抽出物からなる分画；薬用人蔘成分；サポニン分画などの分画構成成分；これらの代謝産物；それらの塩などが挙げられる。以下の説明においては、本発明の「薬用人蔘も

しくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩」又はその一部を、便宜上「薬用人蔘の粗サポニン分画構成成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩」又は「薬用人蔘の粗サポニン分画又はその塩」として表現することもある。これらの用語により本発明を説明すると次のように表現することもできる。

本発明は、薬用人蔘の粗サポニン分画構成成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物に関する。本発明は、神経組織二次変性抑止剤として有用な、薬用人蔘の粗サポニン分画又はその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩にも関する。これらの本発明の医薬組成物は少量静脈内投与用製剤とすることが好ましい。さらに詳細には、単回静脈内投与用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤とすることが好ましい。

また本発明は、薬用人蔘もしくは薬用人蔘の粗サポニン分画に含有される生理活性物質又は活性成分の1つであるジンセノサイドR<sub>b1</sub>をリード化合物として作成される、新規ジンセノサイドR<sub>b1</sub>誘導体すなわち細胞保護剤として有用なジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>にも関する。より詳細には、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための医薬組成物、もしくは神経細胞のアポトーシス、アポトーシス様神経細胞死、又は神経細胞の壊死（ネクローシス）を抑止するための医薬組成物に関する。また、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物、すなわち低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤もしくは単回静脈内注入製剤である医薬組成物に関する。

本発明は、神経外傷・脊髄損傷治療効果、脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物として薬用人蔘に含まれる成分が活性であることを初めて提供するものであり、本発明のこの新規な知見に基づけば、本発明は薬用人蔘に含有される活性成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法を提供するものであり、また、本発明は、脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索するために薬用人蔘に含有される活性成分のリード

化合物としての使用を提供するものである。

さらに、本発明が提供するものは、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫を予防、治療、処置するための低用量の静脈内投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脊髄損傷に伴う褥創を予防、治療、処置するための静脈内持続投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、神経組織の細胞死抑制遺伝子 Bcl-1-xL発現を促進させるための静脈内投与用製剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-1-xLの発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイト保護剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-1-xLの発現を促進するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物である。

また、本発明は薬用人蔘の粗サポニン分画又はその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷・外傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を提供する。より詳細には、本発明は神経組織の損傷による神経組織の二次変性の予防、処置、治療用医薬組成物、脊髄損傷、頭部外傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患の予防、処置、治療用医薬組成物、脱髄を伴う神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物を提供する。また、本発明は、薬用人蔘の粗サポニン分画又はその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物を提供する。本発明は、神経組織二次変性抑止剤として有用な、薬用人蔘の粗サポニン分画又はその成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩をも提供する。

また、本発明は前記疾患や病変の予防、処置又は治療のための有効性分、又は

脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘の活性成分又はその代謝産物の使用を提供する。

さらに、本発明は薬用人蔘の成分もしくは生理活性物質の1つであるジンセノサイドR<sub>b1</sub>をリード化合物として作成できる新規ジンセノサイドR<sub>b1</sub>誘導体、すなわち細胞保護剤として有用なジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>を提供する。より詳細には、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための医薬組成物、もしくはその神経細胞のアポトーシス又はアポトーシス様神経細胞死を抑止するための医薬組成物を提供する。また、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物、すなわち低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤もしくは単回静脈内注入製剤である医薬組成物を提供する。

本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としては、薬用人蔘、その乾燥物、その一部、それらの粉末又は顆粒物、コウジンエキスなどのそれらの抽出物、粗サポニン分画や精製サポニン分画や非サポニン分画などのそれらの分画、それらから分離される精製サポニン類もしくはジンセノサイド類などの成分、それらの成分の活性な代謝産物などが挙げられる。好ましい薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としては、コウジン末が挙げられるがこれに限定されるものではない。

本発明の好ましいコウジン末は、韓国煙草人蔘公社がPanax ginseng C.A. Meyer (和名オタネニンジン) の6年根を用いて調整した公知のものであり、その品質の安定性については、発明者らもすでに公表した論文において確認している (Wen, T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。なお、本邦では、これを販売会社の名にちなんで正官庄コウジン末と呼んでいる。

以下の説明においては、本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としてコウジン末もしくはその抽出物を例として使用する。

本発明の医薬組成物は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を有効成分とする単剤として使用することもできるが、他の

脳卒中危険因子軽減用薬剤（例えばビタミン剤、脳循環代謝改善剤、活性酸素・フリーラジカル消去剤、高脂血症治療薬、等）との合剤として使用することもできる。

また、本発明の医薬組成物は、製薬上許容される担体を含有することができる。これらの担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの医薬の製薬に通常使用されるものを使用することができる。これらの担体を用いて、錠剤、散剤、粉剤、徐放剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤などの剤型に製剤化することもでき、必要に応じてコーティング製剤とすることもできる。また、非経口投与剤として製剤化することもできる。

本発明のコウジン末もしくはその抽出物は、経口投与で虚血巣周辺部（ischemic penumbra）におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより脳梗塞巣を有意に縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経細胞保護薬として利用することができる。

すなわち、本発明のコウジン末もしくはその抽出物は脳卒中が疑われる患者に対して、患者の意識と嚥下機能が保持されている限り、在宅でも経口投与可能な薬物である。また、糖尿病、高血圧症、脳動脈硬化症、心房細動、脳動脈瘤、等の基礎疾患を有する脳卒中予備群とも言えるべき高齢者もしくは脳卒中の既往歴を有する患者が、あらかじめコウジン末を服用しておくこと、万一不幸にして脳卒中発作に見舞われても、コウジン末を服用し続けることにより脳卒中病巣や高次神経機能障害がコウジン末非服用患者に比べて著しく改善する。

脳虚血という病態は脳梗塞のみならず、心不全、重症貧血、ショック、呼吸障害、心停止、心室細動、降圧剤投与、低血圧等に伴って生じることが知られている。これらの疾患から脳を守り患者の予後を改善するためにも、本発明のコウジン末もしくはその抽出物からなる医薬組成物は極めて有効なものである。さらに、コウジン末もしくはその抽出物は歴史的にみても副作用をほとんど示さないことで知られており、本発明者らが今回の各実験例において、コウジン末を経口投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

また、本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物、好ましくはコウジン末を経口投与することにより神経組織における細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現が促進されること、ならびにコウジン末の経口投与が虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することから判断すれば、本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物、好ましくはコウジン末若しくはその抽出物からなる医薬組成物はアポトーシス様神経細胞死を伴う一次性及び二次性神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎、等）に対しても効能を示すと思われる。

さて、体重 60 kg の成人に投与するある薬物の量を 1 とすると、体重 3 kg の新生児に投与する同薬物の量は一般にその 7 分の 1 程度になる。すなわち体重 1 kg あたりの薬物投与量は新生児の場合、成人の約 3 倍になるのである。このことから類推すると新生児よりもさらに体重が少ないラット（体重 250～300 g）やスナネズミ（体重 70～80 g）では、体重 1 kg あたりの薬物投与量は、少なくともヒトの 4 倍程度に増えるものと考えられる。

一般に薬物の血中濃度は腎糸球体濾過量 (GFR) に依存すると考えられている。また GFR は体表面積と相関があることが知られているので、体表面積から割り出した薬物投与量算定法として Crawford の式、すなわち成人量 × 体表面積 ( $\text{m}^2$ ) / 1.73 を用いることができる。体重 60 kg 身長 170 cm のヒトの体表面積は約 1.7  $\text{m}^2$ 、体重 2 kg 身長 45 cm の新生児の体表面積は約 0.16  $\text{m}^2$  であるので、この計算式によれば、体重 60 kg 身長 170 cm のヒトの薬物投与量を 1 としたとき体重 2 kg 身長 45 cm の新生児の薬物投与量は約 10 分の 1 ということになる。すなわち、体重 1 kg あたりの薬物投与量は、体重 60 kg 身長 170 cm の成人で 60 分の 1、体重 2 kg 身長 45 cm の新生児で約 20 分の 1（すなわち成人の 3 倍）となるので、やはり体表面積をもとに薬物

投与量を算出しても、前述のごとく体重 1 kg あたりの薬物投与量は、体重が少なくなるにつれて増加することが分かる。従って、2 kg の新生児よりもさらに体重が少ない SH-S P ラットやスナネズミでは、体重 1 kg あたりの薬物投与量は、ヒト成人（体重 60 kg）の体重 1 kg あたりの薬物投与量と比較して少なくとも 4 倍程度には多くなると考えられる。

ところで、本発明のコウジン末は中大脳動脈皮質枝（MCA）を永久閉塞された SH-S P ラット（体重 250～300 g）において、0.75～1.2 g/kg/日の用量で MCA 永久閉塞前後 5 週間経口投与することにより脳梗塞巣を縮小せしめ場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善するという本実験結果に基づけば、体重 60 kg のヒト脳卒中患者もしくは脊椎動物（ペット、家畜等）に投与する量は、体重あたりその 4 分の 1 として計算すると、1 日総量で 11.25 g から 18 g ということになる。従って、本発明の医薬組成物（コウジン末）のヒト脳卒中患者での経口投与量としては患者の個人差や病状にもよるが、1 日あたり 2.0 g～9.0 g、好ましくは 5.625 g～3.6 g、より好ましくは 11.25 g～1.8 g である。神経組織における Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現増強剤として、コウジン末を既述の一次性及び二次性神経変性疾患の予防・治療・処置に使用する場合も、同様の用量で患者に経口投与することが好ましい。また、コウジン末の抽出物（コウジンエキス、粗サポニン分画、非サポニン分画、各種精製サポニン）を経口投与する際にも、前記の用量のコウジン末から抽出した量を投与することが好ましい。おそらくもっとも好ましい薬用人参（コウジン末）もしくはそのエキスの経口投与法は、体重 60 kg の哺乳動物において 1 日あたり 10 g～30 g を 3～4 回に分けて投与することと考えられる。

このように脳神経疾患の治療・予防・処置のためには比較的高用量のコウジン末を経口投与する必要があるが、末梢臓器における Bcl-x<sub>L</sub> 発現増強剤としてコウジン末を経口投与するときは、比較的低用量で事足りることを本発明では見出している。すなわち 200 mg/kg/日の用量でスナネズミにコウジン末を経口投与することにより、肝臓・脾臓での Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現増強が認められるという本実験結果に基づけば、体重 60 kg のヒトの末梢臓器における Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現を促進するのに必要な量は、体重あたりその 4 分の 1 として計算する

と、50 mg/kg/日ということになる。従って、本発明の医薬組成物（コウジン末）をヒトの末梢臓器における Bcl-xL 発現増強剤として使用する場合には、1日あたりの経口投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、0.6 g～1.5 g、好ましくは1.5 g～6 g、より好ましくは2 g～4 gと考えられる。またこれと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス（紅蔘エキス）ならびに粗サポニン分画を経口投与しても同様に末梢臓器での Bcl-xL 蛋白発現量が増加するものと考えられる。

細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL は細胞を生かすための最後の砦とも言うべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとするあらゆる末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低用量のコウジン末経口投与が肝臓・脾臓等の末梢臓器における Bcl-xL 蛋白発現量を増加させるという本実験結果は、低用量のコウジン末が細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病や老化に伴う諸症状の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、末梢循環不全、褥創、創傷、熱傷、皮膚潰瘍、口腔内アフタ、口内炎、花粉症、春季カタル、アトピー性皮膚炎、エイズ、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、肺梗塞、骨折、筋炎、腱鞘炎、ポリオ、壊死性筋膜炎、阻血性拘縮、二分脊椎、放射線障害、紫外線障害、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、筋・腱付着部炎、筋区画症候群、髄膜瘤、絞扼輪症候群、偽関節、閉塞性血栓性血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、血栓性静脈炎、骨端線離開、骨端症、食中毒、腸管出血性大腸菌感染症、脾炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症、等が含まれる。なお、広義には褥創、熱傷、皮膚潰瘍なども創傷の中に含まれる。その他の細胞死を伴う器質的疾患や病態については、成書（今日の治療指針；監修、日野原重明、阿部正和、医学書院；1995）に記載されているが、前述のすべての疾患や病態の予防・治療・処置のためにコウジン末もしくはその成分が有効と考えられる。

なお、コウジン末、エキス、粗サポニン分画もしくはその構成成分は、細胞保護作用を介して、魚介類・甲殻類の養殖、農作物の栽培・育成、化粧品組成物、

入浴剤、健康食品、健康薬、洗眼液、洗顔液、タバコの栽培、水栽培に利用することができる。もちろん、内分泌攪乱物質、外傷、毒素、微生物、バイオハザード、環境汚染から細胞を保護することもできる。

本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日あたり180g以下、好ましくは100g以下である。

本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる医薬組成物は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなるものが好ましい。また、本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を好ましくは低濃度で含有してなる非経口投与製剤が好ましい。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが患部における細胞外液濃度を低く維持できるのであれば、病変部局所外用剤、病変部局所注射剤、経口投与製剤、点鼻薬、点眼薬、点耳薬、坐薬、皮下注射薬、皮内注射薬、筋肉注射薬、吸入薬、舌下薬、経皮吸収薬等、任意の投与経路が選択できる。

また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>についての本発明は前記の静脈内投与用製剤又は病変部局所外用剤などからなる、浮腫を伴う脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、褥創の予防、処置、治療剤、オリゴデンドロサイトの保護剤、Bcl-x<sub>L</sub>発現増強剤、又は心筋細胞保護剤に関する。

また本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその代謝産物を神経組織又は脊髄損傷による疾患もしくは脳梗塞・脳卒中の予防、処置又は治療用の他の有効成分を探索するためのリード化合物として使用することができることを提供するものである。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択することも可能である。さらにジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脳梗塞・脳卒中・脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すこともできる。

したがって、本発明は、これらの疾患の新しい予防、処置又は治療用の有効成分を検索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその代謝産物を提供するものである。

本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、前記した構造式(I)で示されるものであり、

ジンセノサイド R b<sub>1</sub> は、例えば、柴田ら (Shibata S. et al., Economic and medicinal Plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) の方法に準じて分離・精製することができる。このような方法により精製されたものはその純度が 98% 以上であることが、薄層クロマトグラフィーならびに核磁気共鳴スペクトルにより確認されている (Kawashima Y. and Samukawa K., J. Med. Pharmacol. Soc. Wakan-Yaku, 3, 235-236, 1986)。

本発明のジンセノサイド R b<sub>1</sub> は遊離のものを使用することもできるが、それを適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明のジンセノサイド R b<sub>1</sub> の濃度は、低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下、好ましくは 10 pg/ml 以下、より好ましくは 100 fg/ml 以下となる濃度である。本発明のジンセノサイド R b<sub>1</sub> を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が 0.01 ~ 100 fg/ml もしくは 1 ~ 10000 fg/ml 程度でも十分な効果が得られる。

少量静脈内投与されたジンセノサイド R b<sub>1</sub> は、従来の末梢（腹腔内）投与によるものとは異なり、脳・神経系に速やかに伝達されることがすでに見出されている（特願平 10-365560 号、PCT/JP99/02550、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）。本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リポソーム、脂肪乳剤等に溶解したのちに、単回静脈内注入用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤として使用できる。また、点滴用組成物などの静脈内投与製剤に添加して使用できる剤型であってもよい。また、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成し、任意の投与経路、投与方法を選択することができる。たとえば、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> の水酸基をエステル化してプロドラッグを作成し、脳血液関門を通過せしめたのち、内因性エステラーゼで加水分解して脳内へのジンセノサイド R b<sub>1</sub> 移行量を増やすことも可能となる。

特願平10-365560号、PCT/J P 99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は静脈内持続投与で脳梗塞巣を非投与群の1/4程度にまで縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護薬として利用することができる。すなわち出血傾向を助長しない低用量・低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な医薬組成物である。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を血栓溶解療法を実施する脳梗塞患者に投与することにより、患者の予後が改善する。

それに加えてジンセノサイドRb<sub>1</sub>は特願平11-340850、PCT/J P 99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において記述されたごとく、最長28日間の静脈内持続投与により、脳梗塞病変を1/4程度に縮小するのみならず特に虚血巣周辺部（ischemic penumbra）で破綻・減少した血管網をほぼ正常状態にまで復することができる。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は脳卒中後に破綻あるいは減少した脳血管網の再生・再構築を促進することにより、同薬剤の静脈内投与終了後もひとたび救済された脳組織が時間を経過しても正常に機能することができると思われる。すなわち、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、Bcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現増強ならびにアポトーシス様神経細胞死抑止という神経細胞への直接的な保護効果に加えて、脳血管網の再生・再構築というより間接的かつ長期的に起きる防御機構を介して、障害を受けた脳を守ることが期待される。このように、脳梗塞発症後すなわち脳血管永久閉塞後の静脈内投与により、急性期のみならず発症後1ヶ月目においても脳梗塞病変を4分の1程度にまで縮小せしめる化合物としては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が人類史上最初のものと考えられる。従って、今後ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物をリード化合物として、様々な脳細胞又は神経細胞保護剤を検索、作成製造できる。

一般臨床の場合では、脳卒中後に新たな発作がないにもかかわらず高次神経機能

が持続的に低下し、いわゆる脳卒中後遺症状が悪化の一途をたどる症例があとを絶たない。その理由の1つとして脳卒中発作で破綻・減少した脳血管網の再生や再構築が時として不十分なことがあげられる。このような脳卒中後遺症状の改善のために、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与、舌下投与、挿肛投与もしくは点鼻投与が著効を示すことが期待される。

また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与は特願平11-340850、PCT/J P 99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において発明されたごとく、血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病（大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、痔疾、レイノー症候群等）に効能を示す可能性がある。もちろんこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑止することもジンセノサイドRb<sub>1</sub>の忘れてはならない効能である。従って、末梢組織の血流障害においてもジンセノサイドRb<sub>1</sub>は少なくとも2つの作用機構を介して、組織障害を軽減することが期待される。

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる医薬組成物は特願平11-340850、PCT/J P 99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において発明されたごとく、静脈内持続投与により、一次神経病変とシナプス連絡を有する脳の領域における二次病変を抑止するので、多くの神経変性疾患や脱髄疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症等）の二次病変にも効能を示し、これらの疾病による高次神経機能障害の進行を緩らげ患者のQOL（生活の質、Quality of Life）を高めることが期待される。もちろん、特願平10-365560号、PCT/J P 99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、アポトーシス様神経細胞死抑止効果、Bcl-x<sub>L</sub>発現増強効果を介して、これら神経変性疾患の一次病変にも効果を発揮することが考えられる。

さらに、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は特願平11-340850号、PCT/J P 99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築

促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤)において発明されたごとく、脊髄損傷動物の対麻痺を著しく改善する。周知のごとく、神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・予防・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷・創傷・熱傷等にも有効であることを物語っている。後述の実施例に示すごとく、下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与することにより下肢麻痺(対麻痺)が改善し立ち上がることが可能となる。生理食塩水(すなわちvehicle、媒体)のみを投与された脊髄損傷ラットは両下肢の麻痺をきたしたままで、まったく立ち上がることができなかった。また、現在脊髄損傷治療薬として用いられているソルメドロール(メチルプレドニゾロン)を静脈内投与しても、脊髄損傷ラットの両下肢麻痺(対麻痺)を改善することはできなかった。これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。従って、今後ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、さらに様々な脊髄損傷ならびに神経外傷・外傷治療薬が開発されるものと期待される。

本発明の低用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、静脈内持続投与により、脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫を改善するという新規な効果・効能を示す。従って、脳出血、脳梗塞、脳塞栓、クモ膜下出血、頭部外傷、頭蓋内出血、脊髄損傷、けいれん発作時、けいれん発作後、脳神経外科手術中、脳神経外科手術前後、脊椎外科手術中、脊椎外科手術前後、脊髄外科手術中、脊髄外科手術前後において、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与しておけば前述の疾患、病変、症状、症候に伴う脳神経組織・脊髄組織の浮腫を予防・治療・処置することができる。

また、本発明の低用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は、褥創の予防・治療・処置にも有用であることが新規に見出された。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、寝たきり患者の褥創、特に神経外傷、頭部外傷、脳卒中、脊髄損傷、末梢神経障害、神経痛、神経変性疾患、脱髄疾患等を有する寝たきり患者の褥創に対して優れた効果・効能を示す。

さらに、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、 $10^{-4}$  f g / m l 以下の濃度域でオ

オリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止し、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を上昇せしめるという新規な作用を示した。従って、低濃度・低用量のジンセノサイド  $Rb_1$  はオリゴデンドロサイトの細胞死を伴う疾患（例えば多発性硬化症、ピンズワンガー病、脳の慢性低灌流障害、白質脳炎（leuko-encephalitis）、adrenoleukodystrophy 等）に有用と考えられる。

本発明のジンセノサイド  $Rb_1$  を静脈内投与することにより、脳神経組織においても細胞死抑制遺伝子  $Bcl-x_L$  の発現が上昇することが新規に見出された。脳神経組織には、神経細胞、グリア細胞（アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト）、神経幹細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等が含まれているので、ジンセノサイド  $Rb_1$  の静脈内投与が脳神経組織における細胞死抑制遺伝子  $Bcl-x_L$  の発現を上昇せしめるという事実は、前述の脳神経組織構成細胞のうちのいずれか1つもしくは複数の細胞種が、ジンセノサイド  $Rb_1$  の静脈内投与により  $Bcl-x_L$  発現を上昇せしめると考えられる。すなわち、ジンセノサイド  $Rb_1$  は、前述の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を伴う疾患や症候（たとえば膠原病、動脈硬化症、腎炎、肝炎、血管損傷等）に有効とされる。また、最近では神経幹細胞移植が難治性神経疾患の治療法の1つとして注目を浴びつつあるが、ジンセノサイド  $Rb_1$  を神経幹細胞の保護剤として使用することも可能である。

前述の中樞神経組織や脳・神経細胞に対するジンセノサイド  $Rb_1$  の好ましい効果・効能に加えて本発明のジンセノサイド  $Rb_1$  は、 $1\text{ ng/ml}$  以下の低濃度域で、より詳しくは  $10\text{ pg/ml}$  以下の低濃度域で、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止し、心筋細胞における細胞死抑制遺伝子産物  $Bcl-x_L$  の発現を上昇せしめた。従って、本発明の低用量、低濃度のジンセノサイド  $Rb_1$  は心筋細胞の細胞死を伴うあらゆる疾病（たとえば心筋梗塞、心不全、心筋症、狭心症、不整脈等）に効果・効能を示すとされる。

さらに、本発明のジンセノサイド  $Rb_1$  の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。たとえば特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイド  $Rb_1$  からなる脳細胞又は神経細胞

胞保護剤)に記述されたごとく、一酸化窒素供与体であるニトロプルシッドナトリウム(SNP)処理をしていない通常の培養神経細胞にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を添加しても代謝活性にまったく影響を与えず、SNP処理をして傷害を受けた神経細胞のみを低濃度(1~100fg/ml)のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が保護するので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は正常な神経組織の機能にはあまり影響を与えず、病変部にのみ好ましい効果を発揮することができる。この点は神経保護薬として開発途上にあるグルタミン酸受容体拮抗薬よりもはるかに優れた特性といえる。

また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳室内投与により脳温、脳血流、血圧にも影響が及ばないこともすでに報告されている(Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。発明者らはジンセノサイドRb<sub>1</sub>の60μg/日の静脈内注入によっても、脳血流に変化が生じないことを確認している。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は低用量、低濃度のものを使用する限り出血傾向を助長しないことも知られている。もちろん、本発明者らが、今回の各実験例において、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

特願平10-365560号、PCT/JP99/02550(ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)ならびに本発明で記載されたごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞ラット(体重約300g)において、1日量6μg及び60μgの静脈内持続投与で脳梗塞巣を非投与群の4分の1程度に縮小せしめ、場所学習障害(脳血管性痴呆)を改善せしめ、かつ脳浮腫も顕著に軽減する。しかも本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、同じ静脈内投与量でMCA永久閉塞ラットの虚血巣周辺部(ischemic penumbra)における脳血管の再生・再構築を促進し、大脳皮質梗塞巣(一次病変)の縮小に加えて視床の二次病変(変性)を顕著に抑止する。また、脊髓損傷ラット(下位胸髄損傷ラット)に対しては、1日量60μgもしくは12μgのジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内持続投与で対麻痺もしくは神経麻痺の程度が顕著に改善する。

このような実験結果に基づけば、体重60kgのヒト脳卒中患者の静脈内への至適薬物投与量は、体重当たりで計算すると1日当たり1.2mgから12mgということになる。従って本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者あるいは脊髓損

傷患者での1日あたりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、0.1 mg以上、好ましくは1 mg以上、より好ましくは10 mg以上である。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することからヒトでは、この用量の1/10以下でも十分効能を示す可能性がある。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳神経疾患以外の疾病の予防・治療・処置に使用する時は、前述の投与量と同等もしくはその1/10から1/100000程度の投与量を選択することが好ましい。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり1 g以下、好ましくは0.1 g以下である。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、血管内投与特に静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効成分であるジンセノサイドRb<sub>1</sub>はサポニンの1種であり、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈内投与用製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈内投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば0.01~10 mg/ml、好ましくは0.1~1 mg/ml程度にして投与することができる。

また、本発明における動物実験においては、左中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞後28日間にわたって、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内へ持続注入したが実際の急性期脳卒中症例では、発症後何の治療も施さなければ2週間以内に虚血巣周辺部(ischemic punumbra)における脳血管の破綻・脱落・退縮が急速に進行した結果脑梗塞巣が拡大し、その上脳浮腫もしばしば出現して、一次病変に続く二次病変も非可逆的な状態になるので、この期間内だけでもジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与すれば、脑梗塞病巣の縮小、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築、二次病変抑止、ならびに脳浮腫の改善に役立てることができる。

本発明の薬用人蔘の粗サポニン分画からなる医薬組成物は、薬用人蔘の粗サポニン分画ならびにその成分もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなるものが好ましい。また、本発明の医薬組成物は、静脈内投与や粘膜投与

などの非経口投与形態のものが好ましい。より詳細には、本発明の医薬組成物は、薬用人蔘の粗サポニン分画ならびにその成分もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる非経口投与製剤が好ましい。

また、本発明は、薬用人蔘の粗サポニン分画ならびにその成分もしくはその代謝産物又はそれらの塩を好ましくは低濃度で含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の非経口投与製剤、好ましくは静脈内投与用製剤に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが患部組織における濃度を低く維持できるのであれば、病変部局所外用剤、病変部局所注射剤、経口投与製剤、徐放剤、点鼻薬、点眼薬、点耳薬、坐薬、皮下注射薬、皮内注射薬、筋肉注射薬、吸入薬、舌下薬、経皮吸収薬等、任意の投与経路が選択できる。

また、本発明は前記の静脈内投与用製剤又は病変部局所外用剤などからなる脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、に関する。

また、本発明らは、薬用人蔘の粗サポニン分画もしくはその成分又はその代謝産物が、低用量の静脈内投与により優れた脊髄損傷治療効果を示すことを始めて見出したものであり、したがって本発明は、薬用人蔘の粗サポニン分画ならびにその成分又はその代謝産物を神経組織または脊髄組織の損傷による疾患もしくは脳卒中の予防、処置又は治療用の他の有効成分を探索するためのリード化合物として使用することができることを提供するものである。また、薬用人蔘の粗サポニン分画に含有される成分の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、薬用人蔘の粗サポニン分画の成分もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すこともできる。

したがって、本発明は、これらの疾患の新しい予防、処置又は治療用の有効成分を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘の粗サポニン分画成分又はその代謝産物を提供するものである。

本発明の薬用人蔘の粗サポニン分画は、紅蔘をメタノール抽出し、そのエキス

を水に懸濁して、エーテルで洗浄後、水飽和 1-ブタノールで振出すという通常の方法により得たものであり、収率は約 8 % である。なお、後述の実施例で用いた粗サポニン分画は、本発明者の一人（阪中）の既発表論文（Wen, T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996）において用いたものと同じものである。

本発明の粗サポニン分画ならびにその成分は遊離のものを使用することもできるが、それを適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明の薬用人参の粗サポニン分画の濃度は、低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が、 $145 \text{ ng/ml}$  以下、好ましくは  $14.5 \text{ ng/ml}$  以下、より好ましくは  $145 \text{ pg/ml}$  以下、さらに好ましくは  $1450 \text{ fg/ml}$  以下となる濃度である。本発明の粗サポニン分画を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部組織における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の粗サポニン分画からなる医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が  $14.5 \sim 1450 \text{ fg/ml}$  程度でも十分な効果が得られる。また薬用人参の粗サポニン分画に含まれる成分の濃度も低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が  $10 \text{ ng/ml}$  以下、好ましくは  $1 \text{ ng/ml}$  以下、より好ましくは  $10 \text{ pg/ml}$  以下、さらに好ましくは  $100 \text{ fg/ml}$  以下となる濃度である。本発明の粗サポニン分画構成成分を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部組織における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の粗サポニン分画構成成分のいずれかからなる医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が  $0.01 \sim 100 \text{ fg/ml}$  程度でも十分な効果が得られる。

本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈内に直接投与できるものであればよく、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リボソーム、脂肪乳剤等に溶解したのちに、単回静脈内注入用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤として使用できる。また、点滴用組成物などの静脈内投与用製剤に添加して使用できる剤型であってもよい。また、薬用人参の粗サポニン分画に含有される成分の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成し、任意の投与経路、投与

方法を選択することができる。

さらに、本発明の薬用人蔘の粗サポニン分画の静脈内投与は脊髄損傷動物の麻痺を著しく改善する。周知のごとく、神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、薬用人蔘の粗サポニン分画からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、薬用人蔘の粗サポニン分画が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷・創傷・熱傷等にも有効であることを物語っている。後述の実施例10に示すごとく下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後に薬用人蔘の粗サポニン分画を静脈内投与することにより両下肢麻痺（対麻痺）が改善し立ち上がることが可能となる。この効果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与の効果に匹敵するものであった。一方、生理食塩水（すなわちvehicle、媒体）のみを投与された脊髄損傷ラットは両下肢の麻痺をきたしたままで、まったく立ち上がることができなかった。また、現在脊髄損傷治療薬として用いられているソルメドロール（メチルプレドニゾン）を静脈内投与しても、脊髄損傷ラットの両下肢麻痺（対麻痺）を改善することはできなかった。これらのことから判断すると、薬用人蔘の粗サポニン分画もしくはその成分が、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に、かつてないほど優れた脊髄損傷治療効果を示すものと考えられる。従って、今後薬用人蔘の粗サポニン分画の構成成分もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、さらに様々な脊髄損傷ならびに神経外傷・外傷治療薬が開発されるものと期待される。

このように、本発明では、薬用人蔘の粗サポニン分画を低用量で静脈内へ持続注入すると、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与と同様に、優れた脊髄損傷治療効果が得られたので、このことから判断すると、低用量の粗サポニン分画もしくはその成分の静脈内持続投与はその他の脳神経疾患（たとえば脳卒中、脳梗塞）においても、低濃度・低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様の効果・効能を示すと考えられる。また、特願平10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに特願平11-365560、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者らが見出したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途・作用は、すべて薬

用人蔘の粗サポニン分画もしくはその成分が兼ね備えているものと考えられる。もちろん、薬用人蔘の粗サポニン分画もしくはその成分のいずれかが、低用量、低濃度で、優れた脳神経細胞保護作用、細胞死抑制遺伝子  $Bcl-x_L$  の発現増強作用、脳梗塞・脳卒中治療効果、脊髄損傷・神経外傷治療効果、心筋細胞保護作用、褥創の治療効果、脳浮腫改善効果等を示すと思われる。

さらに、本発明の薬用人蔘の粗サポニン分画の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。

特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイド  $Rb_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに後述の実施例8で記載されたごとく、ジンセノサイド  $Rb_1$  は中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞ラット（体重約300g）において、1日量  $6\mu g$  及び  $60\mu g$  の静脈内持続投与で脳梗塞巣を非投与群の約4分の1程度に縮小せしめ、場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善する。しかも本発明のジンセノサイド  $Rb_1$  は、同じ静脈内投与量でMCA永久閉塞ラットの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）における脳血管の再生・再構築を促進し、脳浮腫を顕著に改善するとともに大脳皮質梗塞巣（一次病変）を縮小せしめ、視床の二次病変（変性）を抑止する。また、脊髄損傷ラット（下位胸髄損傷ラット）に対しては、1日量  $60\mu g$  もしくは  $12\mu g$  のジンセノサイド  $Rb_1$  の静脈内持続投与で神経麻痺の程度が顕著に改善する。さらに、本発明では薬用人蔘の粗サポニン分画（ $870\mu g$ /日）の静脈内持続投与が、ジンセノサイド  $Rb_1$ （ $60\mu g$ /日）の静脈内持続投与とほぼ同等の脊髄損傷治療効果を示した。

このような実験結果に基づけば、ヒト脳卒中患者の静脈内への粗サポニン分画の至適投与量は、体重1kg当たりで計算すると1日当たり  $0.29mg/kg$  から  $2.9mg/kg$  ということになる。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することからヒトでは、この用量の2分の1から20分の1程度にする必要があると考えられる。すなわち粗サポニン分画の静脈内投与を脳神経疾患の予防・処置・治療に使用する時は、患者の病状や個人差にもよるが1日あたり  $14.5\mu g/kg \sim 1450\mu g/kg$  に設定することが好ましい。なお、粗サポニン分画を脳神経疾患以外の疾病の予防・

治療・処置に使用するときには前述の投与量と同等もしくはその $1/10$ から $1/10000$ 程度の投与量を選択することが好ましい。また、粗サポニン分画構成成分のいずれかを静脈内投与するときの投与量は、前述の量の $10$ 分の $1$ 程度を目安にすればよい。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、体重 $60\text{ kg}$ のヒトに対して1日当たり $1\text{ g}$ 以下、好ましくは $0.1\text{ g}$ 以下である。

本発明の粗サポニン分画からなる医薬組成物の投与方法としては、血管内投与特に静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の薬用人蔘粗サポニン分画は、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性の医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈内投与用製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈内投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば $0.1 \sim 100\text{ mg/ml}$ 、好ましくは $1 \sim 10\text{ mg/ml}$ 程度にして投与することができる。なお、粗サポニン分画構成成分のいずれかについても、前述の方法で製剤化することができるが、製剤の濃度は粗サポニン分画の濃度の $10$ 分の $1$ 程度に設定することが好ましい。

本発明のジヒドロジンセノサイド $R_b$ からなる医薬組成物は本発明者の知る限り新規化合物である。本発明のジヒドロジンセノサイド $R_b$ を含有してなる医薬組成物は、ジヒドロジンセノサイド $R_b$ もしくはその代謝産物又はその塩を低濃度で含有してなるものが好ましい。また、本発明のこの医薬組成物は、静脈内投与や粘膜投与などの非経口投与形態のものが好ましい。より詳細には、本発明のこの医薬組成物は、ジヒドロジンセノサイド $R_b$ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる非経口投与製剤が好ましい。

また、本発明は、ジヒドロジンセノサイド $R_b$ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を好ましくは低濃度で含有してなる脳神経疾患もしくは細胞死を伴うあらゆる疾患の予防、処置又は治療用の非経口投与製剤、好ましくは静脈内投与用製剤に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが病変部局所外

用剤、病変部局所注射剤、経口投与製剤、点鼻薬、点眼薬、眼軟膏、点耳薬、坐薬、皮下注射薬、皮内注射薬、筋肉注射薬、吸入薬、舌下薬、経皮吸収薬等、任意の投与経路が選択できる。

また、本発明は前記の静脈内投与用製剤又は病変部局所外用剤などからなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、又は脳細胞もしくは神経細胞保護剤に関する。

また、本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を還元することにより新規に得られた新規なジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩が優れた脳梗塞巣縮小作用を有することを始めて見出したものであり、したがって本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその代謝産物を、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患もしくは脳卒中の予防、処置又は治療用の他の有効成分を探索するためのリード化合物として使用することができることを証明するものである。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脳卒中・頭部外傷・脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すこともできる。

したがって、本発明は、これらの疾患の新しい予防、処置又は治療用の有効成分を探索するためのリード化合物としての薬用人参の成分又はその代謝産物を提供するものである。

本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は前記した構造式(II)で示されるものであり、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、本発明者が所有する高純度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>に水素添加することにより容易に製造することができる。このように作成されたジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>はその純度が98%以上であることが核磁気共鳴スペクトル(NMR)により確認されている。

本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は遊離のものを使用することもできるが、それを適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の濃度は、低濃度が好ましく、より具体

的には、細胞外液濃度が $100\text{ ng/ml}$ 以下、好ましくは $10\text{ pg/ml}$ 以下、より好ましくは $100\text{ fg/ml}$ 以下となる濃度である。本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が $0.01\sim 100\text{ fg/ml}$ もしくは $1\sim 10000\text{ fg/ml}$ 程度でも十分な効果が得られる。

本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>又はその塩からなる静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リボソーム、脂肪乳剤等に溶解したのちに、単回静脈内注入用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤として使用できる。また、点滴用組成物などの静脈内投与製剤に添加して使用できる剤型であってもよい。また、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成し、任意の投与経路、投与方法を選択することができる。たとえば、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>の水酸基をエステル化してプロドラッグを作成し、脳血液関門を通過せしめたのち、内因性エステラーゼで加水分解して脳内へのジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>移行量を増やすことも可能となる。

本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に、静脈内投与で脳梗塞病巣体積を非投与群の $1/4$ 程度にまで縮小させるので、急性期・慢性期の脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護剤として利用することができる。すなわちジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物である。また、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>を血栓溶解療法を実施する前の脳梗塞患者に投与することにより患者の予後が改善する。

それに加えて本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、これを少量静脈内持続投与することにより、脳梗塞病変を $1/4$ 程度に縮小するのみならず虚血巣周辺部（ischemic penumbra）におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止し、さらには虚血巣中心部（ischemic core）における神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞の壊死（ネクローシス）をも抑止する可能性があることが見出された。すなわち、

本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>とほぼ同様の脳梗塞治療効果を示すと言える。しかもジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与量は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与量とほぼ近似していることから判断しても、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>はジンセノサイドRb<sub>1</sub>とほぼ同様の薬理作用を有すると考えられる。すなわち特願平10-365560号、PCT/JP/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに特願平11-243378号、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築保護剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）もしくは特願2000-163026号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる皮膚組織再生促進剤）において本発明者らが見出したジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物の効果・効能・用途・作用は、すべてジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物が兼ね備えているものと考えられる。もちろん、本発明において新規に見出されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途・作用についても、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物が兼ね備えていると考えられる。より具体的には、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる医薬組成物が、優れた脳神経細胞保護作用、細胞死抑制遺伝子Bcl-x<sub>L</sub>の発現増強作用、脳梗塞・脳卒中治療効果、脊髄損傷・神経外傷治療効果、神経組織二次変性抑止作用、脳血管再生・再構築促進作用、心筋細胞保護作用、褥創の治療効果、脳浮腫改善効果等を示すと考えられる。

ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩からなる医薬組成物はアポトーシス様神経細胞死、神経細胞のアポトーシス、グリア細胞のアポトーシスを抑止するので、多くの神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症等）や脱髄疾患（白質脳炎、ピンスワンガー病、脳の慢性低灌流障害、多発性硬化症等）にも効能を示し、これらの疾病による高次神経機能障害の進行を緩らげ患者のQOL（生活の質、Quality of Life）を高めることが期待される。

さらに、本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様にこれと言った副作用を示さない点である。

特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイ

ドR b<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)で記載されたごとく、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>は中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞ラット(体重約300g)において、1日量6 $\mu$ g及び60 $\mu$ gの静脈内持続投与で脳梗塞巣を縮小せしめ、場所学習障害(脳血管性痴呆)を改善する。一方本発明のジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>は、1日あたり6 $\mu$ gの投与量でMCA永久閉塞ラットの大脳皮質梗塞巣(一次病変)を顕著に縮小せしめ、その効果はジンセノサイドR b<sub>1</sub>(6 $\mu$ g/日)の効果に匹敵するものであった。従って、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>を1日あたり60 $\mu$ gの用量でMCA永久閉塞ラットに静脈内投与しても、ほぼジンセノサイドR b<sub>1</sub>を60 $\mu$ g/日の用量で静脈内投与したときと同様の効果がみられると考えられる。

このような実験結果に基づけば、体重60kgのヒト脳卒中患者の静脈内へのジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>の至適薬物投与量は、体重当たりで計算すると1日当たり1.2mgから12mgということになる。従って本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者での1日当たりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、0.1mg以上、好ましくは1mg以上、より好ましくは10mg以上である。しかし一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することから、ヒトでは、この用量の1/10以下でも充分効果を示す可能性がある。逆に、血液脳関門の破綻の程度が軽微な脳神経疾患(たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病を始めとする神経変性疾患、脱髄疾患、神経外傷、一過性脳虚血発作、脊髄損傷、頭部外傷)にジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>を投与するときは、前述の投与量と同量もしくはそれより5~10倍程度用量を増やすことが必要になると考えられる。また、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>を脳神経疾患以外の疾病の予防・治療・処置に使用する時は、前述の投与量と同等もしくはその1/10から1/100000程度の投与量を選択することが好ましい。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり1g以下、好ましくは0.1g以下である。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、血管内投与特に静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効

成分のひとつであるジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> は、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性の医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈内投与製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈内投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば 0.01 ~ 10 mg/ml、好ましくは 0.1 ~ 1 mg/ml 程度にして投与することができる。

次に本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物又はこれらの塩、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>、薬用人蔘の粗サポニン分画、ならびにジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> の作用について詳細に説明する。まず発明者らは、コウジン末（韓国煙草人蔘公社製の 6 年根を原材料としたコウジン末すなわち本邦における正官庄コウジン末）の経口投与による作用を検討した。このために、例えば 12 ~ 13 週齢の雄性 SH-S P ラット（体重 250 ~ 300 g）を使用した。同動物は 12 時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を発明者らの論文に記載した方法を用いて吸入麻酔下で凝固・切離した（Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998）。コウジン末を蒸留水に混入し、MCA 永久閉塞前 1 週間、MCA 永久閉塞後 32 日間、1 日単回経口投与した（0.6 g/kg/日、0.75 g/kg/日、0.9 g/kg/日または 1.2 g/kg/日）。

なお、MCA を閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の蒸留水のみを経口投与した。

MCA 永久閉塞後、発明者らの方法に従って（Zhang, B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998）、2 週目と 4 週目にそれぞれ 4 日間連続で水迷路テストを実施し、SH-S P ラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第 1 図に示す。第 1 図の上側は 2 週目の結果であり、同下側は 4 週

目の結果である。統計解析法はANOVA + FisherのPLSDにより、データは平均±標準偏差（SE）で示されており、\*印は $P < 0.05$ を、\*\*印は $P < 0.01$ であることを示す。第1図中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末 $0.6 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群、黒四角印はコウジン末 $0.75 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群、白三角印はコウジン末 $0.9 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群、黒三角印はコウジン末 $1.2 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群を示す。

第1図のごとくMCA永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、蒸留水投与虚血群に比べて、コウジン末 $0.75 \sim 1.2 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群で有意に改善された。特にコウジン末 $0.9 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群でもっとも良好な効果がみられた。なお、SH-SPラットの泳水速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロールにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した（第3図参照）。左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率（%）を算出した。その結果を第2図に示す。統計解析法はMann-Whitney Uテストにより、データは平均±標準偏差（SE）で示されており、\*印は $P < 0.05$ を、\*\*印は $P < 0.01$ であることを示す。左側は蒸留水を用いたコントロールであり、その右側の4種がコウジン末を用いたものであり、左から $0.6 \text{ g/kg/day}$ 投与群（黒斜線）、 $0.75 \text{ g/kg/day}$ 投与群（横線）、 $0.9 \text{ g/kg/day}$ 投与群（斜線）、 $1.2 \text{ g/kg/day}$ 投与群（白抜き）をそれぞれ示す。

第2図に示されるごとく、コウジン末 $0.75 \sim 1.2 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。特にコウジン末 $0.9 \text{ g/kg/day}$ 投与虚血群で最も効果が強く、その大脳皮質梗塞比率の平均値が蒸留水投与虚血群の2分の1以下に減少していた。このことから、実際の脳梗塞体積は、コウジン末 $0.9 \text{ g/kg/day}$ の経口投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

第3図の上段に蒸留水投与虚血群の脳梗塞巣（4例）の写真を、第3図の下段にコウジン末0.9g/kg/日投与虚血群の脳梗塞巣（4例）の写真を、図面になる写真として示す。

また第4図に本実験の方法及び結果をまとめた模式図を示す。まず、試験ラットの中大脳動脈を永久閉塞し、これを2群に分け、1群にはコウジン末を経口投与し（第4図の下段）、他の1群には蒸留水を経口投与（第4図の上段）する。その後、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到達するまでの時間を測定した。

蒸留水投与虚血群では脳梗塞病巣部が大きく虚血側の脳半球に脳浮腫も認められ、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到達するまでに長時間を要しているのに対して、コウジン末投与虚血群においては病巣部が縮小して脳浮腫も軽減しており、この結果水迷路テストにおいて目的のプラットホームに短時間で到達している。

この実験に用いたMCA永久閉塞動物（脳梗塞ラット）は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデル（ヒト一過性脳虚血発作のモデル）よりも重篤でありかつヒトの脳梗塞の病態に近いモデルである。従って、このMCA永久閉塞動物において、コウジン末の経口投与が著効を示したということは、コウジン末が脳梗塞や脳浮腫の予防・治療・処置に有用であることを物語っている。経口投与により、このように画期的な効果を示す薬物としてはコウジン末が世界で最初のものと考えられる。

特願平10-365560（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、本発明者ら（阪中、田中）は、コウジン末の主成分であるジンセノサイドRb<sub>1</sub>の少量静脈内持続投与がMCA永久閉塞ラットの脳梗塞巣を顕著に縮小せしめることを発明している。しかし、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>そのものを経口投与しても神経細胞保護効果を示さないことを最近発明者は確認しているので、目下の所コウジン末が急性期脳梗塞ならびにそれに伴う学習行動障害の予防・治療・処置に利用される経口用医薬組成物として非常に有用なものと思われる。事実、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>やコウジン末を経口投与しても血中にジンセノサイドRb<sub>1</sub>は検出されず、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>自体を単独で経口投与しても何ら生理

作用は認められないと報告されている（赤尾光昭ら、The Ginseng Review, 22, 97-102, 1996）。

コウジン末の成分は大きく分けて粗サポニン分画と非サポニン分画からなるが、粗サポニン分画は、さらにプロトパナキサジオール系サポニン、プロトパナキサトリオール系サポニン、オレアノール酸系サポニンから構成される。プロトパナキサジオール系サポニンの代表がジンセノサイドR<sub>b1</sub>、プロトパナキサトリオール系サポニンの代表がジンセノサイドR<sub>g1</sub>、オレアノール酸系サポニンの代表がジンセノサイドR<sub>o</sub>である（Shibata, S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985）。これまでこれら3つの代表的精製サポニンのほかに、30種類前後の精製サポニンの化学構造が決定されている。コウジン末の経口投与が明らかに神経細胞保護効果（神経細胞死抑止効果）を示し、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>自体の経口投与にはそのような効果がないことから判断すると、コウジン末中にはジンセノサイドR<sub>b1</sub>以外にも神経細胞保護作用を示す物質が豊富に含まれることがまず想定される。ただし、コウジン末を経口投与することによりジンセノサイドR<sub>b1</sub>の分解が抑止され測定閾値以下のジンセノサイドR<sub>b1</sub>が消化管より血中に吸収される可能性は否定できないので、このように微量血中移行したジンセノサイドR<sub>b1</sub>とコウジン末中の他の神経細胞保護物質の効果があいまって、有意な脳梗塞巣の縮小と場所学習能力障害改善作用がもたらされたと推測することも不可能ではない。コウジン末中に含まれるジンセノサイドR<sub>b1</sub>以外の神経細胞保護物質の候補として、これまで化学構造が決定された精製サポニンもしくはジンセノサイド類、粗サポニン分画ならびに非サポニン分画に含まれる未知の成分があげられる。

さて、MCAが永久閉塞するとMCAだけで栄養されている部位すなわち虚血中心部（ischemic core）の神経細胞はMCAが再開通しない限り、すみやかに壊死（ネクローシス）に陥り脳梗塞病変が形成されるので、いかなる薬物といえども虚血中心部の脳組織を救うことはまず困難と考えられる。なお、細胞死はその形態学的特徴よりネクローシス（壊死）とアポトーシスに大別されている。ただ、神経細胞死に関しては、ネクローシスという概念は定着しているものの、一方のアポトーシスについては、病的成熟脳で類似の現象は観察されるがリンパ球にみ

られるような典型的特徴を示すものが非常に少ない。従って、本明細書ではネクローシスとは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を“神経細胞のアポトーシス”あるいは“アポトーシス様神経細胞死”と定義することにする。しかし、神経細胞死を壊死（ネクローシス）とアポトーシス様神経細胞死に区別することすら困難な例もあることは周知の事実である。たとえば神経細胞が死に至る際、当初アポトーシス様の形態をとるものの、ある時期を境にして突然ネクローシスの特徴を呈するいわゆるpost-apoptotic necrosisという現象が存在することも事実である。そこで、本明細書ではこのような区別をすることが困難な場合には、単に神経細胞死という用語を使うこととする。

一方、神経細胞の壊死（ネクローシス）が起こる虚血中心部（ischemic core）とは異なり虚血巣周辺部（ischemic penumbra）ではMCAからの血液供給がまったくなくなったあとでも、わずかながら前大脳動脈や後大脳動脈の皮質枝から血液供給があるので、同部の神経細胞はMCA閉塞後しばらくは瀕死の状態で生きていると考えられる。もちろん何の手だても施さなければ虚血巣周辺部（ischemic penumbra）でやがてアポトーシス様神経細胞死が起こり同部がすべて脳梗塞病変に様変わりすることは周知の事実である。臨床的にはこの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞を救うことがもっとも大切であるが、このことを可能にならしむるほど強力に神経細胞保護作用を示す経口投与用医薬組成物は、発明者の知る限りこれまで皆無であった。

本発明者らは、SH-S PラットのMCAを永久閉塞する1週間前より、MCA永久閉塞後4週間までコウジン末を経口投与しておく、同ラットの大脳皮質梗塞体積が非投与群の約4分の1程度にまで縮小し、場所学習障害も有意に改善することを証明した。このことは、糖尿病、脳動脈硬化症、高血圧症、心房細動、等の基礎疾患を有する患者すなわち脳梗塞予備群と総称される患者や高齢者もしくは脳卒中既往歴を有する患者が、あらかじめコウジン末を服用しておけば、不幸にして脳梗塞発作に見舞われた場合でも引き続きコウジン末を経口投与することにより、脳梗塞病変が著しく改善され脳血管性痴呆症も抑止されることを物語っている。さらにコウジン末の経口投与により脳梗塞病巣体積が非投与群の4分の1程度に縮小したことは、同薬剤の経口投与が虚血巣周辺部（ischemic penum

bra) における神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を顕著に抑止したことを明らかにするものである。

一般に、神経細胞保護剤や保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合にもっとも大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液関門に遮断されてその効果・効能が激減あるいは発現しないことがほとんどである。ましてや神経細胞保護剤や保護因子の経口投与となると、消化管での分解・吸収、血中への移行量・移行速度、血中での分解、脳血液関門での障壁、等、越えるべきハードルが山積みしている。最近ようやく、本発明者ら（阪中、田中）は特願平 10-365560（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記載されたごとく、優れた静脈内投与用神経細胞保護剤を発明することができたが、この静脈内投与用神経細胞保護剤（すなわちジンセノサイド Rb<sub>1</sub>）ですら、単に経口投与しただけでは神経細胞保護作用を示さないことを最近発明者らは確認した。もちろん、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> でも、消化管での分解を阻止する担体（たとえばゼラチン、油層、シェラック等）あるいは消化管での吸収を促進する担体に混入・封入又は結合させたのちに、経口投与剤として使用できる可能性は残されているが、目下の所経口投与用神経細胞保護剤としてはコウジン末がその効果・効能を斟酌した場合、世界中でもっとも優れたものと思われる。発明者の知る限り、コウジン末は世界で唯一の優れた経口投与用神経細胞保護剤である。

次に本発明者らは、MCA を永久閉塞した後にコウジン末の経口投与を開始してその効果を調べた。MCA 永久閉塞の前後にコウジン末を経口投与した前述の実験において 0.9 g/kg/日の用量でコウジン末を投与したときにもっとも良好な結果が得られたので、本実験ではこの用量で実験を実施した。12～13 週齢の雄性 SH-S P ラット（体重 250～300 g）の左中大脳動脈皮質枝

（MCA）を吸入麻酔下で凝固・切離したのち、麻酔を終了した。同動物が麻酔から覚醒した後に、コウジン末を 0.9 g/kg/日の用量で 1 日単回 32 日間経口投与した。なお、MCA を閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）には、蒸留水のみを投与した。

MCA 永久閉塞後、発明者らの方法に従って（Zhang, B., et al., J. Stroke

Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-S Pラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第5図に示す。第5図の上段は2週目の結果であり、同下段は4週目の結果である。統計解析法はANOVA + FisherのPLSDにより、データは平均±標準偏差(SE)で示されており、\*印は $P < 0.05$ であることを示す。また、第5図の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒四角印はコウジン末 $0.9 \text{ g/kg}$ /日投与虚血群を示す。参考として、第1図で用いた偽手術群の実験値を黒丸印で示す。

第5図に示されるごとく、MCA永久閉塞後(脳梗塞後)の場所学習障害が、コウジン末 $0.9 \text{ g/kg}$ /日の虚血後経口投与で蒸留水注入虚血群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後4週目に良好な効果がみられた。なお、SH-S Pラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-S Pラットを抱水クロールにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率

(%)を算出した。その結果を第6図に示す。統計解析法はMann-Whitney Uテストにより、データは平均±標準偏差(SE)で示されており、\*印は $P < 0.05$ であることを示す。左側は蒸留水を用いたコントロールであり、その右側はコウジン末 $0.9 \text{ g/kg/day}$ 投与群(黒斜線)を示す。

第6図に示されるごとく、コウジン末 $0.9 \text{ g/kg}$ /日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。しかしながら、その効果は、MCA永久閉塞前後にコウジン末を $0.9 \text{ g/kg}$ /日の用量で投与した場合と比べて、弱いものであった。従って、コウジン末は脳梗塞が起こる前から、服用(経口投与)し始め、不幸にして脳梗塞に見舞われても経口投与し続けることが肝要であると考えられる。もちろん、コウジン末をMCA永久閉塞

後に経口投与した場合の効果は、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞後に静脈内持続投与した場合の効果に比べて（特願平10-365560、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）不十分であるが、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>のような速効性のある静脈内投与製剤が普及していないことを考えると、コウジン末の経口投与を脳梗塞発症後に開始することも次善の策として可能と思われる。

医療機関でのみ可能な薬物の静脈内投与や点滴静注に比べて、少なくともコウジン末の経口投与は、いつでもどこでも脳梗塞患者の意識と嚥下機能が保持されている限り実施可能であるという利点を備えていると思われる。また、脳梗塞患者の意識や嚥下機能が芳しくないときには、胃管を挿入することにより長期的に医療機関のみならず在宅でも、コウジン末を投与できるので、その利用価値は極めて高いと思われる。また、コウジン末はすでに人類が数千年の長きにわたって服用している薬物であるので、その安全性も確立されていることを考えると、少なくともジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が一般臨床の場で適用されるまでは、急性期脳梗塞患者にコウジン末を速やかに経口投与することが重要かつ必須の治療上の選択肢となることを、本発明は明らかにするものである。

次に、本発明者らはコウジン末の経口投与がどのようなメカニズムで神経細胞を保護するかを調べた。もしこの作用メカニズムが解明されればコウジン末の新たな効果・効能が発明されるものと期待される。このため、本発明者らは細胞死抑制遺伝子産物であるBcl-x<sub>L</sub>蛋白に着目した。Bcl-x<sub>L</sub>蛋白は神経組織、免疫系組織、皮膚組織、循環系組織を始めとするあらゆる組織に発現しており、細胞が生存する上で重要な役割を担っていることが証明されている（Adams, J.M. and Cory, S. Science, 281, 1322-1326, 1998; Boise, L.H. et al., Cell, 74, 597-608, 1993; Gottschalk, A.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7350-7354, 1994; Gonzalez-Garcia, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4304-4308, 1995）。

そこで、本発明者らはコウジン末の経口投与が神経組織におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現を増加させるかどうか、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べた。本発明者らの既発表の論文において（Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med.,

188, 635-649, 1998)、本発明者らは一過性前脳虚血後の海馬CA1領域においてBcl-xL蛋白の発現量を調べる実験系を確立しているため、この系を用いてコウジン末経口投与の効果を検討した。

ところで、第7図に示すように、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回、7日間コウジン末を0.9g/kg/日又は1.5g/kg/日の用量で経口投与しておく、蒸留水投与虚血群に比べて海馬CA1領域の神経細胞死が有意に予防され、受動的回避学習実験の反応潜時も延長することを、本発明者の1人(阪中)はすでに論文として発表している(Wen, T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。

第7図の上段は反応潜時(秒)を示し、下段は神経細胞密度(数/mm)を示す。左側の白抜きの2本は偽手術のものを示し、その左側は偽手術で無処理群を、右側は偽手術で蒸留水投与群を示す。右側の黒抜きの4本は、左から蒸留水投与虚血群、コウジン末0.6g/kg/日投与虚血群、コウジン末0.9g/kg/日投与虚血群、コウジン末1.5g/kg/日投与虚血群をそれぞれ示す。

特にスナネズミにおいてはコウジン末1.5g/kg/日投与虚血群で0.9g/kg/日投与虚血群よりも良好な効果が見られるため、本実験ではコウジン末を1.5g/kg/日の用量で5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回7日間経口投与し、5分虚血後さらにコウジン末を経口投与した。最後のコウジン末投与から24時間目に海馬CA1領域の組織を採取した。その後電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。泳動により分離された蛋白をさらにニトロセルロース膜に転写し、抗Bcl-xL蛋白抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。偽手術動物ならびに5分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物(虚血コントロール動物)には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、1.5g/kg/日という高用量のコウジン末経口投与が、末梢臓器のBcl-xL蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。以上の実験手順の詳細は発明者らの既報(Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)に記述されている。結果を第8図に示す。第8図は、コウジン末1.5g/kg/日投与による、海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白の発現の結果を

示す図面に変わる写真である。左側の4本が偽手術のものであり、中央の4本がコウジン末投与のものであり、右側の4本が蒸留水投与のものである。

また、各4検体における、抗Bcl-xL蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した。結果を第9図に示す。第9図の縦軸はBcl-xL蛋白発現量を示し、グラフの左から偽手術（黒色）、コウジン末投与群（黒斜線）、蒸留水投与群（破線斜線）をそれぞれ示す。統計解析法はANOVA+ Scheffé's post hocテストにより、\*\*印は $P < 0.01$ であることを示す。

第8図に示すごとく、コウジン末を $1.5 \text{ g/kg/日}$ の用量でスナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回、7日間経口投与し虚血負荷直後にも同量のコウジン末を単回経口投与すると、24時間後海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白発現量は、偽手術群ならびに蒸留水投与虚血群に比べて、全例で増加していた。この抗Bcl-xL蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果、第9図に示すごとくコウジン末の経口投与が海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白発現量を有意に増加させることが判明した。しかし、このように高用量のコウジン末を経口投与しても肝臓や脾臓におけるBcl-xL蛋白発現量は増加しなかった。

本発明者らは次に、低用量のコウジン末を1週間よりも長期にわたり経口投与すれば海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白の発現量が増加するかどうか調べた。このため、たとえば $200 \text{ mg/kg/日}$ の用量で、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する4週間前より1日単回経口投与し、5分虚血直後にさらに単回経口投与した。24時間後に海馬CA1領域を採取し、第8図に示した実験同様抗Bcl-xL蛋白抗体によるウエスタンブロッティングを実施した。偽手術動物ならびに5分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物）には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、 $200 \text{ mg/kg/日}$ のコウジン末経口投与が、末梢臓器のBcl-xL蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。

第10図に、 $200 \text{ mg/kg/日}$ のコウジン末経口投与による、肝臓におけるBcl-xL蛋白の発現の結果を示す。第10図のA（上段）は、ウエスタンブ

ロットティングの結果を示す図面に変わる写真であり、左側の4本は蒸留水投与群を、右側の4本はコウジン末投与群をそれぞれ示す。第10図のB（下段）は各4検体における、抗Bcl-x<sub>L</sub>蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果を示す。第10図のBの縦軸はBcl-x<sub>L</sub>蛋白発現量を示し、グラフの左側は蒸留水投与群（破線斜線）を、右側はコウジン末投与群（黒斜線）をそれぞれ示す。統計解析法はANOVA+Scheffe's post hocテストにより、\*印はP<0.05であることを示す。

第11図に、200mg/kg/日のコウジン末経口投与による、脾臓におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現の結果を示す。第11図のA（上段）は、ウエスタンブロットティングの結果を示す図面に変わる写真であり、左側の4本は蒸留水投与群を、右側の4本はコウジン末投与群をそれぞれ示す。第11図のB（下段）は各4検体における、抗Bcl-x<sub>L</sub>蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果を示す。第11図のBの縦軸はBcl-x<sub>L</sub>蛋白発現量を示し、グラフの左側は蒸留水投与群（破線斜線）を、右側はコウジン末投与群（黒斜線）をそれぞれ示す。統計解析法はANOVA+Scheffe's post hocテストにより、\*印はP<0.05であることを示す。

しかしながら、コウジン末を200mg/kg/日の用量で4週間経口投与しても海馬CA1領域におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現量には有意な増加は認められなかった。また、200mg/kg/日の用量でコウジン末を5分虚血前4週間、1日単回経口投与し、さらに5分虚血後同じ要領で1週間コウジン末を経口投与しても、スナネズミの受動的回避学習障害ならびに海馬CA1領域の神経細胞死は軽減されなかった。このことは、低用量のコウジン末経口投与によりBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現量の増加が誘導されなければ、神経細胞保護効果もみられないことを物語っている。言い換えれば、1.5g/kg/日という高用量のコウジン末をスナネズミに1週間程度経口投与した結果、第8図のごとく海馬CA1領域におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現量が増加し、第7図に示すごとく同領域における虚血性神経細胞死が軽減されたと考えられる。脳室内投与で海馬CA1領域のBcl-x<sub>L</sub>蛋白量を増加せしめることにより、同領域の神経細胞を保護する生理活性物質として、本発明者らはインターロイキン3を同定しているが（Wen, T.-C. e

l al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)、経口投与により同様の作用を有する薬剤は本発明者の知る限りコウジン末が世界で唯一のものである。おそらく、MCAを永久閉塞された動物の虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) でも、高用量のコウジン末をあらかじめ経口投与することにより同部でのBcl-x<sub>L</sub>発現量が増加して、脳梗塞巣が縮小したと思われる。ただし、MCAを永久閉塞したラットの虚血巣周辺部におけるBcl-x<sub>L</sub>蛋白発現量を増加させるのに必要なコウジン末投与はスナネズミの場合より少量であり、第2図の結果から推測すると0.75~1.2 g/kg/日と思われる。

前述のごとく、スナネズミとSH-SPラットでは、神経細胞死を抑止するのに必要なコウジン末投与量は異なることにも注意する必要がある。体重75 g程度のスナネズミでは明らかに1.5 g/kg/日のコウジン末経口投与が、神経細胞を虚血侵襲から効果的に保護すると考えられるが、体重300 g程度のSH-SPラットでは明らかに0.9 g/kg/日のコウジン末経口投与量が1.2 g/kg/日のコウジン末投与量よりも、良好な神経細胞保護効果を示すことが第2図から読みとれる。従って、動物の体重が増加するのに逆比例して、神経細胞保護作用を発揮するために必要なコウジン末の至適投与量は減少するものと考えられる。このことは、ヒトの場合にもあてはまる。例えば、体重60 kgの成人に投与するある薬物の量を1とすると、体重3 kgの新生児に投与する同薬物の量は一般にその7分の1になる。すなわち体重1 kgあたりの薬物投与量は新生児の場合、成人の約3倍になるのである。このことから類推すると、新生児よりさらに体重が少ないSH-SPラットやスナネズミでは、体重1 kgあたりの薬物投与量は新生児の1.5倍程度にはなると考えられる。すなわち、体重1 kgあたりのコウジン末投与量は、SH-SPラットやスナネズミの場合、少なくともヒトの4倍程度に増えるものと考えられる。

ところで、第2図の結果によれば、MCAを永久閉塞されたSH-SPラットの大脳皮質梗塞巣は、コウジン末を0.75~1.2 g/kg/日の用量でMCA閉塞前後に投与することにより有意に改善される。従って体重60 kgのヒトに対しては、コウジン末として0.185~0.3 g/kg/日の用量で、同様の効果が期待されることになる。おそらく、体重60 kgのヒトの脳細胞 (グリア

細胞を含む)又は神経細胞の保護のために必要なコウジン末の投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、1日あたり2.0g~90g、好ましくは5.625g~36g、より好ましくは11.25g~18gとなる。また、これと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス(紅蔘エキス)ならびに粗サポニン分画を経口投与しても同様の脳細胞又は神経細胞保護効果が期待される。さらに粗サポニン分画に関しては、経口投与剤としてのみならず、静脈内投与剤、徐放剤、点鼻薬、吸入薬、舌下錠、坐薬、局所注入剤、皮膚外用剤、局所塗布剤、筋内注射薬、皮内注射薬、皮下注射薬としても使用可能である。特に静脈内投与剤として粗サポニン分画を使用する際には、後述の実施例10に示すごとく経口投与の場合よりも量を少なくする必要がある。また、使用するコウジン末としては、韓国煙草人蔘公社製のオタネニンジン6年根から調整したものが好ましいが、成分が類似しているものであればあるいは一定量以上の神経細胞保護成分を含有しているものであれば、その他任意の産地由来のコウジン末や白蔘を経口投与しても神経細胞保護効果が得られる。

前述のごとく、200mg/kg/日の用量でコウジン末を、スナネズミに脳虚血を負荷する前に4週間経口投与しても、海馬CA1領域でのBcl-xL蛋白発現量は増加しなかったが、同量のコウジン末を同様のスケジュールで経口投与すると、第10図及び第11図に示すごとく肝臓や脾臓におけるBcl-xL蛋白の発現量が有意に増加した。スナネズミにおいて200mg/kg/日のコウジン末投与により、肝臓や脾臓でBcl-xL蛋白発現量が増加したことより、前記の体重1kgあたりの投与量算出理論を適用すれば、体重60kgのヒトではおよそ50mg/kg/日のコウジン末投与で肝臓及び脾臓でのBcl-xL蛋白発現量が増加することが予想される。すなわち体重60kgのヒトの肝臓及び脾臓でのBcl-xL蛋白発現を増強するために必要なコウジン末の投与量としては、個人差にもよるが、1日あたり0.6g~15g、好ましくは1.5g~6g、より好ましくは2g~4gと考えられる。また、これと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス(紅蔘エキス)ならびに粗サポニン分画、非サポニン分画を経口投与しても同様に末梢臓器でのBcl-xL蛋白発現量が増加するものと考えられる。さらに、粗サポニン分画や非サポニン分画に関しては経口投与剤とし

てのみならず、静脈内投与剤、点鼻薬、吸入薬、舌下錠、坐薬、局所注入剤、徐放剤、皮膚外用剤、局所塗布剤、筋肉注射薬、皮内注射薬、皮下注射薬としても使用可能である。特に静脈内投与剤として粗サボニン分画を使用する際には、経口投与の場合よりも量を少なくする必要がある。

このように、高用量のコウジン末経口投与により脳神経組織における B c l - x L 蛋白の発現量が増加し、神経細胞保護効果が発揮され、低用量のコウジン末経口投与により肝臓、脾臓を始めとする末梢臓器で B c l - x L 蛋白発現量が増加するのが本発明の特徴である。神経組織には、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞が含まれ、肝臓や脾臓には、肝細胞、免疫担当細胞、白血球、リンパ球、赤血球、クッパー細胞、線維芽細胞、脂肪摂取細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞等が含まれるので、これらの細胞のいずれかでコウジン末（薬用人参）経口投与により B c l - x L 蛋白の発現増強が起こるものと考えられる。これまで、神経組織における B c l - x L 蛋白の発現量を増加せしめる物質として、インターロイキン 3 とジンセノサイド R b<sub>1</sub> を本発明者らは同定しているが（Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998 ; 特願平 10 - 365560、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）、経口投与により脳細胞もしくは神経細胞の B c l - x L 蛋白発現量を増加させる薬剤としては、高用量のコウジン末が世界で唯一のものである。薬用人参成分ジンセノサイド R b<sub>1</sub> そのものの経口投与は神経細胞保護作用を示さないので、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> 単独投与では脳の B c l - x L 蛋白発現量を増加せしめることはまず有り得ないと考えられる。もちろん、脳室内投与したときのみ脳における B c l - x L 蛋白発現量を増加せしめ、神経細胞保護作用を示すインターロイキン 3 もペプチドであるが故に、消化管ですぐに分解され、しかも脳血液関門を通過できないので、経口投与により神経細胞保護効果を発揮するとは思えない。なお、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> とプロサボシン関連ペプチド（特願平 11 - 185155）はともに脳室内投与により M C A 永久閉塞ラットの脳梗塞を顕著に縮小せしめ、しかも極めて低濃度で B c l - x L 発現増強作用を介して細胞保護作用を示す。このことから判断すると、その他の成長因子類、サイトカイン類、ケモカイン類、非ペプチド性化合物類（たとえばプロスタグランジン類、イソカルバサイクリン類）

等の中でも、もし脳室内投与により脳梗塞巣縮小作用を示すものがあれば、同様の低モル濃度域でB c 1 - 2 蛋白群の発現調節を介して細胞保護作用を示すと考えられる。さらに、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>とプロサボシン関連ペプチドの効果・効能・用途は共通していると考えられる。

さて、高用量のコウジン末経口投与が肝臓・脾臓のB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現量には影響を与えなかったことは、生体の恒常性を維持する上で非常に重要なことと思われる。すなわち、高用量のコウジン末を経口投与することによりコウジン末に含まれるB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分が過剰に消化管から吸収され、血液循環を介して肝臓・脾臓を始めとする末梢臓器に到達するが、このような末梢臓器ではたとえ一時期B c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現量が増加しても、その後速やかにB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現量がダウンレギュレーション (down-regulation) されてB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白量がコントロール値に戻るものと思われる。あるいは、高用量のコウジン末を経口投与しても、末梢臓器におけるB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現増加はまったく起こらない可能性も充分あると思われる。従って、生体がある一定量のコウジン末経口投与に対してのみ、反応するということは、コウジン末をヒトに大量投与あるいは長期投与しても副作用がほとんど認められないことを支持するものである。また、コウジン末を低用量であれ高用量であれ、経口投与した際には、消化管の上皮組織は高濃度のB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分に暴露されるはずであるが、これまでコウジン末を経口投与したヒトにおいて消化器癌等が高頻度で発症するという報告もなく、もちろん消化器系副作用出現の報告もほとんどみられない。一方、高用量のコウジン末を経口投与することにより血中に過剰のB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分が流れても、脳血液関門を通過できるB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分はそのうちのごく一部になると思われるので、脳に関しては高用量のコウジン末を経口投与したときのみ至適量のB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分が神経細胞又は脳細胞に到達し、同細胞におけるB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白の発現量が増加するものと思われる。

また、逆に低用量のコウジン末を経口投与したときには、B c 1 - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分は高用量のコウジン末を経口投与した場合に比べて、少量血中に移行するため、おそらくこの至適濃度のB c 1 - x<sub>L</sub>発現促進成分が肝臓・脾臓を始めとする末梢臓器のB c 1 - x<sub>L</sub>蛋白を増加せしめるものと考えられる。しかし、低用

量のコウジン末を経口投与しても、B c l - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分の血中濃度はそれほど高くないので、脳血液関門を通過して脳に到達する同成分が不足するため、脳内のB c l - x<sub>L</sub>蛋白量は増加せず神経細胞保護効果もみられなくなると推測される。

このように生理活性物質あるいは薬剤がある一定の細胞外液濃度で存在するときのみ、細胞に作用するという概念はすでに生命科学領域で定着しつつあるものと発明者らは考えている。エリスロポエチンを例にとつてこのことをもう少し詳しく説明すると、発明者の一人（阪中）は脳室内投与されたエリスロポエチンの1日量が2.5ユニットから25ユニットの範囲内であるときのみ、海馬C A 1錐体神経細胞の保護作用が発揮され、エリスロポエチンの1日投与量がそれよりも多くてもあるいは少なくとも神経細胞保護作用がみられないことをすでに公表している（Sakanaka, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998）。

コウジン末中に含まれるB c l - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分の候補として、粗サポニン分画の各種精製サポニンもしくはジンセノサイド類、非サポニン分画が考えられる。粗サポニン分画に含まれる精製サポニン（プロトパナキサジオール系サポニン、プロトパナキサトリオール系サポニン、オレアノール酸系サポニン）については庄司の著書（庄司順三、薬用人参サポニンの化学、pp 251-261、薬用人参'95、熊谷 朗編、1994、共立出版）に既述されている。プロトパナキサジオール系サポニンの代表であるジンセノサイドR b<sub>1</sub>はコウジン末1g中に約4mg前後含有されているが、もしコウジン末として経口投与することにより、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>の消化管での分解が抑止されるか、あるいはジンセノサイドR b<sub>1</sub>の消化管での吸収が促進された結果、測定感度以下のジンセノサイドR b<sub>1</sub>がわずかながらも血中に移行するのであれば、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もB c l - x<sub>L</sub>蛋白発現促進成分の1つとして挙げられる。ただ、コウジン末を経口投与してもジンセノサイドR b<sub>1</sub>は血中に検出されないといわれており、さらにジンセノサイドR b<sub>1</sub>自体を経口投与しても血清中や各臓器にジンセノサイドR b<sub>1</sub>は検出されないと報告されているので（赤尾光昭ら、The Ginseng Review, 22, 97-102, 1996）、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>単独の経口投与が神経組織や末梢臓器でB c l - x<sub>L</sub>

蛋白発現を促進する可能性はまずないと思われる。事実、これまでの報告によればジンセノサイドRb<sub>1</sub>自体を経口投与しても、何ら生理作用は認められないし、本発明者らもジンセノサイドRb<sub>1</sub>の経口投与では神経細胞保護作用も認められないことをすでに確認している。従って、特願平10-365560（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護効果）にも既述したごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が神経細胞保護作用を発揮するためには、血中にある一定濃度以上存在する必要があると思われる。

ミトコンドリア関連タンパクであるBcl-x<sub>L</sub>はApaf1と結合することにより、Apaf1とプロカスパーゼ9（procaspase 9）との結合を阻害するといわれている（Adams, J. M. and Cory, S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。Bcl-x<sub>L</sub>蛋白の減少あるいは機能低下が起きると、Apaf1がBcl-x<sub>L</sub>蛋白から解離し、ミトコンドリアからのチトクロームCの漏出とあいまって、プロカスパーゼ9が活性化されると考えられている（Adams, J. M. and Cory, S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。ひとたび細胞質内のプロカスパーゼ9が活性化されると引き続いてカスパーゼ9（caspase 9）ならびにカスパーゼ3（caspase 3）が活性化され、これらの蛋白分解酵素により細胞は自己融解し、死（アポトーシス）に至る過程が加速される。おそらく、プロカスパーゼ9が活性化された段階で、細胞が死に至る運命が決定される可能性が高いので、経口投与用Bcl-x<sub>L</sub>蛋白発現増強剤（コウジン末）によりプロカスパーゼ9の活性化をくい止めることが、細胞死を防ぐための得策と考えられる。

さて、発明者の一人（阪中）はスナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷した後1週間、コウジン末を経口投与しても海馬CA1領域の神経細胞は保護されないことを発表しているので（Wen, T.-C., et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）、コウジン末をヒト一過性脳虚血発作の治療や処置に実用化することは困難であると1996年当時判断していた。しかし、本発明では、スナネズミの一過性前脳虚血発作よりも重篤でかつヒト脳梗塞の病態を反映するMCA永久閉塞SH-SPラットにおいて、コウジン末をMCA永久閉塞後から4週間程度経口投与すると第5図、第6図に示すごとく場所学習障害の改善と脳梗塞巣の縮小が認められた。従って、本発明により、脳梗塞後にコウジン末を4週間程度

経口投与すれば脳梗塞治療効果が発揮されることが明らかにされた。

従って、スナネズミの一過性前脳虚血モデルでも、虚血後4週間程度コウジン末を経口投与すれば海馬CA1領域の神経細胞保護効果が認められるかも知れないと本発明者らは推測した。しかしながら、スナネズミの5分間前脳虚血モデルでは、虚血後1週間以内に海馬CA1領域の神経細胞がほとんどすべて死に至ってしまうので、4週間にわたるコウジン末経口投与の効果を判定するのには、このモデルは不適當と考えられた。そこで、本発明者らはスナネズミの3分間前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を4週間経口投与したときの効果を判定することにした。

スナネズミの脳温を $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に維持した状態で3分間両側総頸動脈の血流を遮断し、再灌流させると、1週間後に海馬CA1領域の神経細胞が約半数死に至ることを発明者の一人（阪中）はすでに発表している（Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 95, 4635-4640, 1998）。しかも、この時点で生存していると考えられる海馬CA1領域の神経細胞において、アポトーシス様細胞死の指標である核の断片化がさらに進行中であることが、TUNEL染色法により発明者らは確認している（Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998）。従って、3分間の一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では、5分間虚血を負荷した場合と異なり、虚血後1週目以降も神経細胞変性が進行することが明らかにされている。本発明者らは、このように比較的長期にわたって神経細胞死が進行する3分間の一過性前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を虚血後4週間経口投与したときの効果を調べた。

発明者らの方法に準じて（Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998）、吸入麻酔下でスナネズミの脳温を $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に維持しながら両側総頸動脈血流を3分間遮断した。同動物が麻酔から覚醒したのちに、コウジン末を $1.5\text{ g/kg}$ の用量で1日単回28日間経口投与した。偽手術動物と3分間の前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物）には、同量の蒸留水のみを

経口投与した。その後、ステップダウン型受動的回避学習実験を実施し、次いで同動物をペントバルビタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒド及び2.5%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定した。脳を摘出したのち、パラフィンに包埋し、5  $\mu$ mの厚みのパラフィン切片を作成した。各動物の海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を発明者らの方法により計測した (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。以下に前掲の論文で記述したステップダウン型受動的回避学習実験の概略を記述する。

3分虚血後28日目にスナネズミを受動的回避学習実験装置の安全域（プラットフォーム）に置くと、当初スナネズミは何度か下のグリッド部に降りるが、その都度電撃刺激を受けて安全域に戻る。5分間の訓練施行中に、多くのスナネズミは安全域にとどまるようになる。24時間後、グリッド部の電源を切った状態で、再びスナネズミを安全域に置き、グリッド部に降りるまでの時間（反応潜時）を測定して、同動物の学習能力の指標とした。

結果を第12図及び第13図に示す。第12図のA（上段）は受動的回避学習実験の反応潜時（秒）を、第12図のB（下段）は海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度（数/mm）を示す。各グラフの左側（白抜き）は偽手術を、中央（黒）は蒸留水投与群を、右側（黒）はコウジン末1.5g/kg/日投与群をそれぞれ示す。第12図のAに示すごとく、コウジン末を3分虚血後4週間経口投与すると、受動的回避学習実験の反応潜時が蒸留水投与虚血群に比べて有意に延長した。また、第12図のBに示すごとくコウジン末の経口投与により、海馬CA1領域の神経細胞密度も蒸留水投与虚血群に比べて有意に増加していた。

第13図のA（上段）は偽手術動物、B（中段）は蒸留水投与虚血動物、C（下段）はコウジン末経口投与虚血動物の、海馬CA1領域の光学顕微鏡像をそれぞれ示す、図面に代わる写真である。第13図に示すごとく、偽手術動物

(A) に比べて、蒸留水投与虚血動物では(B) 3分虚血後、1週間目以後も神経細胞がさらに変性脱落し（死に至り）、虚血後1週間に生存していた正常の2分の1程度の海馬CA1神経細胞が、虚血後28日目にはさらに正常の4分の1

前後まで減少することがわかった。しかし、コウジン末を3分虚血負荷後から28日間経口投与しておく（C）、虚血後一週間目から28日目までに起こる神経細胞死が有意に抑止されることが判明した。

従って、3分虚血という比較的軽い脳虚血負荷でも脳の神経細胞は徐々に死に至り、生体の高次神経機能が損なわれることを本モデル動物は示している。このモデル動物と類似した神経細胞の長期変性とも言うべき現象は、軽症の一過性脳虚血発作・脳梗塞・脳出血・クモ膜下出血発作を経験した患者、一酸化炭素中毒患者、神経変性疾患を有する患者にもみられることがある。これらの患者に共通する特徴は、当初高次神経機能障害が比較的軽微であっても、時間を経るにつれて、脳において神経細胞死がゆっくりと進行するため、高次神経機能障害が重症化するということである。Bcl-xL蛋白発現増強作用を有するコウジン末を3分虚血後に経口投与しておく、緩徐に進行する海馬CA1神経細胞変性が抑止されるという実験事実は、高用量のコウジン末経口投与が前記の患者の治療に有効であるということを物語っている。以上のようにコウジン末の経口投与はBcl-xL蛋白の発現上昇を介して、細胞死を伴うあらゆる疾患や病態に効果・効能を発揮する。従って、今後新たな細胞死を伴う疾患が同定された場合にもコウジン末、コウジンエキス、粗サポニン分画、ジンセノサイド類を第一選択薬として使用できる。

前述の薬用人参（コウジン末）の経口投与実験の次に、本発明者は少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与で脳梗塞（脳塞栓）後の脳浮腫が改善するかどうかを調べた。

このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6 $\mu$ g又は60 $\mu$ g）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6 $\mu$ g/日又は60 $\mu$ g/日）した。

なお、MCAを永久閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水（vehicle、媒体）のみを投与した。

MCA 永久閉塞後 32 日目に、SH-S P ラットを抱水クロラルにて麻酔し、4% パラホルムアルデヒドを含有する 0.1 M リン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。

結果を第 14 図に、図面に代わる写真として示す。

第 14 図の上段が生理食塩水投与脑梗塞（脳塞栓）例 8 個体の脳を背側より撮影した実体顕微鏡写真である。第 14 図の下段がジンセノサイド Rb<sub>1</sub> (6  $\mu$ g/日) 静脈内持続投与脑梗塞（脳塞栓）例 8 個体の脳を背側より撮影した実体顕微鏡像である。脳の先端が写真の右側を向くように配列してあるので、黒くなった脑梗塞病変を有する左大脳半球は大脳縦裂の上側にみられる。大脳縦裂の下側にみられる正常の右大脳半球は、一部分のみ実体顕微鏡写真に含まれている。第 14 図の上段に示すごとく、生理食塩水投与脑梗塞例では、脑梗塞（脳塞栓）発症後 32 日目には、左大脳半球の黒く見える脑梗塞病巣が大きく拡大し、程度の差はあるもののすべての例において左大脳半球が右大脳半球より大きくなっている。特に上段に示した生理食塩水投与脑梗塞例のうち、1 段目の右端の脳及び 2 段目の左から 2 番目の脳において、左大脳半球が右大脳半球より明らかに大きくなっている。このことは、MCA が永久閉塞した左大脳半球に脳浮腫が出現し、おそらく脳圧も亢進していることを物語っている。

一方、第 14 図の下段に示すごとくジンセノサイド Rb<sub>1</sub> (6  $\mu$ g/日) 静脈内投与脑梗塞（脳塞栓）例では、全例において明らかに脑梗塞病巣が縮小しており、左大脳半球と右大脳半球の大きさにもほとんど差は認められない。すなわち、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 静脈内持続投与によりコウジン末の経口投与の場合と同様に脳浮腫がみられなくなったのである。

なお、特願平 10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに特願平 11-340850、PCT/JP99/06804（ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）は左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率（%）を算出した。その結果、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 静脈内投与脑梗塞群で

生理食塩水投与脳梗塞群に比して、大脳皮質梗塞比率が有意に減少していた。この大脳皮質梗塞比率は梗塞面積をもとに算出したのであるが、その比率の平均値がジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与群で生理食塩水投与群の50%程度あるいはそれ以下に減少していたことから、実際の脳梗塞体積は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与により生理食塩水投与群の約4分の1程度に縮小したことになる。改めて言うまでもなく、脳血管の一部（たとえばMCA）が永久閉塞したのちに、静脈内へ少量持続投与することにより、脳梗塞病巣体積をMCA永久閉塞後32日目においても生理食塩水投与脳梗塞例の4分の1程度に縮小せしめる化合物としては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が歴史上最初のものと考えられる。おそらく低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、アポトーシス様神経細胞死抑止作用、Bcl-x<sub>L</sub>発現促進作用、脳血管再生・再構築促進作用等複数の極めて優れた作用機構を介して、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の脳細胞（グリア細胞）や神経細胞を長期にわたって虚血侵襲から守るものと考えられる（特願平10-365560、PCT/J P 99/02550、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤；特願平11-340850、PCT/J P 99/06804、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）。さらに、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与する限りにおいては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は出血傾向を助長しないので、脳梗塞のみならず脳出血やクモ膜下出血を発症した患者に対しても、CT検査で脳卒中の病型診断を下す前に少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を速やかに静脈内投与できる。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は従来の血栓溶解剤よりも広い用途・効果・効能を有すると言える。

低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が有する前述の好ましい作用機構に加えて、本発明ではジンセノサイドRb<sub>1</sub>が優れた脳浮腫の予防・治療・処置剤となることが見出された。一般に、脳浮腫もしくは神経組織の浮腫という病態は脳出血、脳梗塞、脳塞栓、クモ膜下出血、頭蓋内出血、頭部外傷、神経外傷、中毒、脳炎、脳腫瘍、髄膜炎、脊髄損傷、けいれん発作時、けいれん発作後、脳神経外科手術中、脳神経外科手術後、脊椎外科手術中、脊椎外科手術後、心停止もしくは呼吸停止後に蘇生した際、等においてしばしば出現し、患者の生命予後や神経症状に悪影響を与えることが知られている。従って、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投

与が脳梗塞（脳塞栓）発症後の脳浮腫を治療するという事を見出した本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が前述の疾病、疾患、症状、症候に伴う脳神経組織の浮腫の予防・治療・処置にも有用であることを物語っている。

さらに、生体組織の浮腫という病態は、脳血管が永久閉塞した脳組織のみならず、末梢の血管が閉塞した場合や末梢臓器・組織の血流が障害された場合にも、生じることが知られている。従って、脳血管（MCA）が永久閉塞した後に少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与して脳浮腫が改善・治療されたという本実験結果に基づけば、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は末梢組織や末梢臓器の循環障害（たとえば大動脈炎症候群、膠原病、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、血栓性静脈炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、網膜中心動静脈閉塞症、レイノー病、レイノー症候群、外傷、痔疾、心筋梗塞、褥創、糖尿病性皮膚潰瘍、末梢循環不全、狭心症、肝・腎・心虚血再灌流障害等）に効能を示すと考えられる。もちろん、前記の疾病のうち痔疾や褥創に伴う病変組織の浮腫に対しては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を適当な基剤に混入した上で外用塗布もしくは挿肛投与してもよい。

さて、特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が、従来報告された高用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の末梢（腹腔内）投与、高用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の単回静脈内投与ならびにジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳室内投与の虚血脳保護作用からはまったく想像することすら及ばなかった程に、優れた脳梗塞巣縮小効果を示すことを、本発明者ら（阪中、田中）がすでに発明している。すなわち、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>（6～60 $\mu$ g/日）をSH-SPラットの中大脳動脈皮質枝永久閉塞後（すなわち脳塞栓発症後）に28日間静脈内投与することにより、脳塞栓発症後約1ヶ月においても脳梗塞（脳塞栓）巣が対照群（生理食塩水投与脳塞栓ラット）の約4分の1程度に縮小することが、前述の発明において見出されたわけである。このように、脳塞栓発症後に静脈内投与でき、脳梗塞（脳塞栓）病巣体積を発症後約1ヶ月目においても対照群の4分の1程度に縮小せしめる医薬組成物としてはジンセノサイドRb<sub>1</sub>が歴史上最初のものであると思われる。ちなみにジンセノサイドRb<sub>1</sub>は

薬用人蔘中に含有される精製サポニン分画の中のひとつの成分であるが、経口投与により血中ではまったく検出されず、本発明者らの経験でもジンセノサイドRb<sub>1</sub>単独の経口投与では虚血脳保護作用はほとんど認められないので、本発明者ら（阪中、田中）が前述の特許（特願平10-365560号、PCT/JP99/02550、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）を出願するまでは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>自体、特にその経口投与の薬理作用は否定されてきたわけである（小橋ら、薬用人蔘'95、pp213-221、熊谷 朗編、共立出版株式会社）。従って、特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、初めて静脈内へ持続投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>が薬用人蔘とは独立したより優れた効果・効能・用途をもつことが明らかにされたのである。

ところで、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>単独の経口投与がさしたる虚血脳保護作用を示さないのに、コウジン末の経口投与が本発明のごとくジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与には劣るものの、優れた虚血脳保護作用を発揮するという実験結果は、コウジン末の中にジンセノサイドRb<sub>1</sub>以外の神経細胞保護成分が含有されていることを示唆している。また、特願平10-365560号、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、本発明者ら（阪中、田中）は低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が優れた脊髄損傷・神経外傷の治療効果を発揮することを発明しているので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と構造が類似している他の精製サポニンも同様の効果を有する可能性があると考えられた。そこでこのことを検証するために、本発明者らは脊髄損傷モデルラットを用いて、薬用人蔘（コウジン末）の粗サポニン分画の静脈内持続投与の効果を調べた。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくは薬用人蔘の粗サポニン分画には、第15図に示すごとくジンセノサイドRb<sub>1</sub>に加えて少なくとも30種類前後の類似化学構造を有する精製サポニン類もしくはジンセノサイド類が含まれているので（庄司、薬用人蔘'95、pp251-261、熊谷 朗編、共立出版株式会社）、もし低用量の粗サポニン分画（crude ginseng saponin、CGS）の静脈内持続投与が、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に脊髄損傷治療効果を示せば、粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかが神経外傷や脊髄損傷の予防・治療・処置

のために利用できると言える。

第15図に粗サポニン分画に含有されているサポニン類を示す。第15図のジンセノサイド  $Ra_1$ ; ジンセノサイド  $Ra_2$ ; ジンセノサイド  $Ra_3$ ; ノトジンセノサイド  $R_4$ ; 次に、ジンセノサイド  $Rb_1$  ( $R=H$ )、キンケノサイド  $R_1$  ( $R=CH_3CO-$ )、マロニルジンセノサイド  $Rb_1$  ( $R=HOOC-CH_2CO-$ ) ; さらに、ジンセノサイド  $Rb_2$  ( $R=H$ )、ジンセノサイド  $RS_1^*$  ( $R=CH_3CO-$ )、マロニルジンセノサイド  $Rb_2$  ( $R=HOOC-CH_2CO-$ )、左から3番目がジンセノサイド  $Rc$  ( $R=H$ )、ジンセノサイド  $RS_2^*$  ( $R=CH_3CO-$ )、マロニルジンセノサイド  $Rc$  ( $R=HOOC-CH_2CO-$ ) ; ジンセノサイド  $Rd$  ( $R=H$ )、マロニルジンセノサイド  $Rd$  ( $R=HOOC-CH_2CO-$ )、ジンセノサイド  $Rb_3$ 、(20S)ジンセノサイド  $Rg_3^*$ ; ジンセノサイド  $Rg_3$ 、ジンセノサイド  $Rh_2^*$ 、20-グルコジンセノサイド  $Rf$ 、ジンセノサイド  $Re$ 、ノトジンセノサイド  $R_1$ 、ジンセノサイド  $Rf$ 、ジンセノサイド  $Rg_1$ 、ジンセノサイド  $Rg_2$ 、(20R)-ジンセノサイド  $Rg_2^*$ 、ジンセノサイド  $Rh_1$ 、(20R)-ジンセノサイド  $Rh_1^*$ 、チクセツサポニンV (ジンセノサイド  $Ro$ ) である。

そこでまず本発明者らは、脊髓損傷ラットを用いて、ジンセノサイド  $Rb_1$  静脈内持続投与の効果を調べ、その効果を粗サポニン分画静脈内投与の効果と比較した。脊髓のある分節たとえば下位胸髄に圧負荷が加わると、同部の灰白質神経細胞のみならず同部の白質伝導路が障害を受ける。白質伝導路の障害はさらに遠位部(尾側)へと進展し、かつ伝導路の起始細胞すなわち伝導路に線維を投射している上位の神経細胞体(すなわち起始細胞)の二次変性をもたらす。このようにして、圧負荷を受けた下位胸髄の白質伝導路の障害は、伝導路の起始細胞体(神経細胞体)ならびに下位胸髄以下(すなわち腰髄、仙髄)の伝導路の二次変性を惹起することにより、両下肢の対麻痺を引き起こす。また、下位胸髄の損傷により、腰髄・仙髄に対する上位の脳からの神経支配が途絶えるため、さらに腰髄・仙髄の灰白質でも神経細胞の二次変性が進行し、両下肢の対麻痺が回復不能となるものと思われる。発明者らは、このような脊髓損傷のモデルとして、下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷された雄性ウィスターラット(体重約300g)

を用いた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb<sub>1</sub> (12  $\mu$ g または 60  $\mu$ g) を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb<sub>1</sub> (12  $\mu$ g/日 または 60  $\mu$ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (vehicle、媒体) を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのOpen field locomotor scores (Basso, Bettie and Bresnakan (BBB) scores) を計測して運動能力の指標とした (Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996)。ちなみに偽手術ラット (正常ラット) のBBB scores (BBBスコア) は20ないし21である。

第16図は脊髄損傷当日及び翌日の生理食塩水投与ラットならびにジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) 投与ラットをそれぞれ示す、図面に代わる写真である。第16図の下段の2匹のラットが写っている写真は、脊髄損傷当日の写真であり、左側のラットは生理食塩水投与のものであり、右側のラットはジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与ラット (静脈内60  $\mu$ g/日) である。第16図の上段の左側の写真は脊髄損傷翌日のジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与ラットのものであり、右側は生理食塩水投与ラットのものである。

第16図に示すごとく、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷された当日は生理食塩水投与ラットならびにジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与ラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷したのちに30分以上経過してからジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) を静脈内投与すると、第16図に示すごとく1～2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。一方、生理食塩水投与ラットの対麻痺はまったく改善しなかった。

脊髄損傷後7日目のBBB scores (スコア) にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第17図に示す。第17図の縦軸はBBBスコアの点数を示し、横軸はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与量 ( $\mu$ g/日) を示す。統計解析法はMann-Whitney Uテストにより、データは平均値±標準誤差で示されており、\*印は

$p < 0.01$ 、\*\*印は  $p < 0.005$ であることを示す。

第17図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与の用量に依存して有意に改善する。

なお、脊髄損傷治療薬として現在臨床現場で使用されているソルメドロール（メチルプレドニゾン）を  $30 \text{ mg/kg}$  の用量で発明者らが作成した脊髄損傷ラットの大腿静脈にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を投与する場合と同様のスケジュールで静脈内投与しても有意な神経麻痺改善効果はみられず、およそ40%（10匹中4匹）の実験動物が脊髄損傷後7日以内に死亡した。また、ソルメドロール投与ラットでは背部の手術創の治癒が生理食塩水投与ラットに比べて明らかに遅延したが、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与ラットではそのような副作用は認められなかった。このことは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脊髄損傷・神経外傷治療薬としてはソルメドロールよりも優れた特性を有していることを物語っている。しかも、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与量はソルメドロールの投与量よりもはるかに少なく、さらにジンセノサイドRb<sub>1</sub>はソルメドロールのような免疫機能抑制作用や消化性潰瘍誘発作用を有していないので、極めて安全な脊髄損傷・神経外傷治療薬となることが期待される。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。おそらくジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物が極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するものと思われるが、このことはジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物が脊髄損傷・神経外傷治療のためのリード化合物になり得ることも支持している。本実験結果は、さらに低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脊髄損傷後の神経組織二次変性をも抑止することを支持している。

また、周知のごとく神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・予防・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が中枢神経組織以外の組織すなわち末梢組織の外傷・創傷・熱傷等にも有効であることを物語っている。

このようにジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物をリード化合物として新

規脊髓損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髓損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

また、脊髓損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている (Crowe, M. J. et al., *Nature Med.* 3, 73-76, 1997; Emery, E. et al., *J. Neurosurg.* 89, 911-920, 1998)。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が顕著に脊髓損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髓損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明の低用量・低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>はオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患 (多発性硬化症、ビンスワンガー病、脱髄脳炎、脳の慢性低灌流障害等) の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が脊髓損傷ラットの両下肢麻痺 (対麻痺) を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織がジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与により再生することも示している。

次に、薬用人参の粗サポニン分画が低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与の効果と同様の効果を示すかどうかを調べるため、本発明者らは、前述の脊髓損傷モデル動物の静脈内に粗サポニン分画を低用量で持続投与した。なお、粗サポニン分画は、本発明者の一人 (阪中) の論文 (Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.* 91, 15-22, 1996) で使用されたものを投与した。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈に粗サポニン分画 (870  $\mu$ g) の生理食塩水溶解液を単回注入し、さらに同静脈へ粗サポニン分画 (870  $\mu$ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照脊髓損傷動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (vehicle、媒体) を投与した。結果を第18図及び第19図に示す。第18図は粗サポニン分画投与例を、第1

9 図は生理食塩水（vehicle、媒体）投与例を示す、図面に代わる写真である。第 18 図の左中段が脊髄損傷を負荷した当日のものであり、左下段がその翌日のものであり、下段右側が 2 日後のものであり、右中段が 4 日後のものであり、上段の大きな写真が 7 日後のものである。第 19 図では、左下段が脊髄損傷を負荷した当日のものであり、右下段がその翌日のものであり、中段右側が 2 日後のものであり、右上段が 4 日後のものであり、左上段の大きな写真が 7 日後のものである。

第 18 図に示すごとく、脊髄損傷を負荷した当日には、ラットは両下肢の対麻痺をきたし、粗サポニン分画を静脈内投与しても立ち上がることができないが、翌日より粗サポニン分画を静脈内投与したラットの下肢対麻痺が改善し始め、脊髄損傷後 7 日目には、オープンフィールドの外壁（高さ 8 cm）をささえにして同ラットは立ち上がることが可能となった。一方、脊髄損傷負荷後に生理食塩水のみを投与したラットでは、第 19 図に示すごとく、脊髄損傷後 1 週間を経過してもまったく下肢対麻痺に改善はみられなかった。

なお、脊髄損傷治療薬として現在臨床現場で使用されているソルメドロール（メチルプレドニゾン）を 30 mg / kg の用量で、発明者らが作成した前述の脊髄損傷ラットの大腿静脈に粗サポニン分画を投与する場合と同様のスケジュールで静脈内投与してもまったく麻痺改善効果はみられなかった。また、ソルメドロール投与ラットでは、背部の手術創の治癒が生理食塩水投与ラットに比べて明らかに遅延したが、粗サポニン分画投与ラットではそのような副作用は認められなかった。このことは、粗サポニン分画が脊髄損傷・神経外傷治療薬としてはソルメドロールよりも優れた特性を有していることを物語っている。しかも、粗サポニン分画の投与量はソルメドロールの投与量よりも少なく、さらに粗サポニン分画はソルメドロールのような免疫機能抑制作用や消化性潰瘍誘発作用を有していないので、極めて安全な脊髄損傷・神経外傷治療薬となることが期待される。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、低用量の粗サポニン分画からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果はジンセノサイド Rb<sub>1</sub> と比べて遜色ないくらい優れたものと考えられる。従って粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかもしくはそれらの代謝産物が極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するも

のと思われるが、このことは粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかもしくはそれらの代謝産物が脊髄損傷・神経外傷治療のためのリード化合物になり得ることも支持している。本実験結果は、さらに粗サポニン分画に含有される精製サポニン（第15図）のいずれかが脊髄損傷後の神経組織二次変性をも抑止することを支持している。なお、本実験では、オタネニンジン（Panax ginseng C.A. Meyer）の粗サポニン分画を用いたが、その他の薬用人参（たとえば三七人参、人参田七、ヒマラヤ人参、アメリカ人参、チクセツニンジン等）の粗サポニン分画を用いても同様の結果が得られると考えられる。従って、前述の薬用人参の粗サポニン分画に含有される成分のいずれかが脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷の予防・治療・処置に有用であると考えられる。

また、周知のごとく神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので粗サポニン分画からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、低用量・低濃度の粗サポニン分画が中枢神経組織以外の組織すなわち末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。

また、脊髄損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている（Crowe, M.J. et al., Nature Med. 3, 73-76, 1997; Emery, E. et al., J. Neurosurg. 89, 911-920, 1998）。低用量の粗サポニン分画の静脈内持続投与が顕著に脊髄損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかがオリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髄損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明の粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかがオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患（多発性硬化症、ピンズワンガー病、脳の慢性低灌流障害、白質脳炎等）の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、粗サポニン分画の静脈内投与が脊髄損傷ラットの両下肢麻痺（対麻痺）を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織が粗サポニン分画投与により再生することも示している。

また、脊髄損傷を起こした神経組織では、しばしば当該脊髄組織に浮腫が生じ

神経症状（上肢又は下肢の対麻痺、性機能障害、排尿・排便困難等）を悪化せしむると言われているが、低用量の粗サポニン分画の静脈内持続投与が優れた脊髄損傷治療効果を示すという本実験結果は、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画に含有される成分のいずれかが脊髄組織の浮腫の予防・治療・処置に有用であることを物語っている。

以上の結果から、低用量の粗サポニン分画又はその塩を含有している静脈内投与用製剤が脊髄損傷による神経組織の二次変性を抑止することが発明された。さらに、粗サポニン分画からなる医薬組成物は脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷の画期的治療薬となるのみならず、末梢組織の外傷にも効果・効能を示すことが期待される。

このように粗サポニン分画の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、粗サポニン分画に含有される成分もしくはそれらの代謝産物をリード化合物として新規脊髄損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、粗サポニン分画に含有される成分もしくはそれらの代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

さて、前述の脊髄損傷ラットを用いた実験結果において、薬用人参の粗サポニン分画（ $870 \mu\text{g}/\text{日}$ ）の静脈内持続投与が、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$ （ $60 \mu\text{g}/\text{日}$ ）の静脈内持続投与と同様の効果を示したということは、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  よりおよそ 14.5 倍程度多い粗サポニン分画を持続投与すれば、患部組織の細胞外液において有効な粗サポニン分画の濃度が維持できることを示している。ちなみに本発明者ら（阪中、田中）は、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  が患部組織における細胞外液濃度が  $1 \text{ ng}/\text{ml}$  以下、好ましくは  $10 \text{ pg}/\text{ml}$  以下、より好ましくは  $100 \text{ fg}/\text{ml}$  以下となる濃度で効果・効能を発揮することを特願平 10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）ならびに後述の実施例 15、16 において明らかにしている。従って、本発明の低用量の粗サポニン分画に関しては、患部組織における細胞外液濃度が、 $14.5 \text{ ng}/\text{ml}$  以下、好ましくは  $145 \text{ pg}/\text{ml}$  以下、より好ましくは  $1450 \text{ fg}/\text{ml}$  以下となるように製剤を調整することが

好ましい。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は患部組織の細胞外液濃度が1～100 fg/ml程度でも十分な効果が得られるので（特願平10-365560、PCT/JP99/02550、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）本発明の粗サポニン分画からなる医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が14.5～1450 fg/ml程度でも十分な効果が得られる。

ところで、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 μg/日）の静脈内持続投与は、特願平10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において本発明者ら（阪中、田中）により明らかにされたごとく、優れた脳卒中・脳梗塞治療効果を発揮することが判明している。また、前述の実験結果から、粗サポニン分画（870 μg/日）の静脈内持続投与が、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 μg/日）の静脈内持続投与と同様に、優れた脊髄損傷治療効果を示すことも明らかになった。これらのことから考えると、粗サポニン分画（870 μg/日）の静脈内持続投与は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>

（60 μg/日）の静脈内持続投与と同様に、優れた脳卒中・脳梗塞治療効果を発揮することが容易に推測できる。さらに、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 6 μg/日の静脈内持続投与も優れた脳梗塞・脳卒中治療効果を示すことより、粗サポニン分画87 μg/日の静脈内持続投与も優れた脳梗塞・脳卒中治療効果を発揮すると考えられる。すなわち、薬用人参の粗サポニン分画は体重約300 gのラットにおいて、1日あたり87 μgから870 μgの静脈内持続投与により、優れた脳細胞又は神経細胞保護作用を示すと言える。従って1日あたり2.9 mg/kgから0.29 mg/kgの粗サポニン分画を静脈内へ持続投与することにより、優れた脳細胞保護効果もしくは神経細胞保護効果が得られることになる。しかし、これはあくまでも体重300 g程度のラットに対する粗サポニン分画投与量の目安であって、粗サポニン分画をヒトに静脈内投与するときは、体重1 kgあたりの投与量を、前述の量の2分の1から20分の1程度にする必要があると考えられる。すなわち、ヒトに粗サポニン分画を静脈内持続投与するときは、患者の病状や個人差にもよるが1日あたり1450 μg/kg以下、14.5 μg/kg以上に設定することが好ましい。

また、後述の実施例14で示すごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 μg/日）

の静脈内持続投与により、脳神経組織の Bcl-xL 遺伝子発現が上昇するので、粗サポニン分画 ( $870 \mu\text{g}/\text{日}$ ) の静脈内持続投与でも Bcl-xL 遺伝子発現が増加すると考えられる。すなわち、粗サポニン分画は、患部組織における細胞外液濃度が、 $14.5 \text{ ng}/\text{ml}$  以下、好ましくは  $145 \text{ pg}/\text{ml}$  以下、より好ましくは  $1450 \text{ fg}/\text{ml}$  以下の濃度で、神経細胞の Bcl-xL 遺伝子の発現を促進すると考えられる。

さらに、低用量の粗サポニン分画の静脈内持続投与が、脊髄損傷・脳梗塞・脳卒中の予防、治療、処置に有用であるということは、粗サポニン分画に含有される成分のいずれかが前述の脳・神経疾患に対して優れた効果・効能を示すことを明らかにしている。もちろん、粗サポニン分画の複数の成分が前述の脳・神経疾患に対して優れた効果・効能を示すことも考えられる。さて、粗サポニン分画の中に含有される代表的な成分である精製サポニン類としてはジンセノサイド Ro、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub>、ジンセノサイド Rb<sub>2</sub>、ジンセノサイド Rc、ジンセノサイド Rd、ジンセノサイド Re、ジンセノサイド Rf、ジンセノサイド Rg<sub>1</sub>、ジンセノサイド Rg<sub>2</sub>、ジンセノサイド Rg<sub>3</sub>、ジンセノサイド Rh<sub>1</sub>、ジンセノサイド Rh<sub>2</sub> 等であるが、このうちジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の含量が他の精製サポニンの 2 倍量以上存在することが知られている。ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は、患部における細胞外液濃度が  $1 \text{ ng}/\text{ml}$  以下、好ましくは  $10 \text{ pg}/\text{ml}$  以下、より好ましくは  $100 \text{ fg}/\text{ml}$  以下のときに神経細胞もしくは脳細胞保護作用を示すことを考えると、その他の精製サポニンもこれと同等ないし、それよりも 10 分の 1 程度低い濃度域で脳細胞又は神経細胞を保護するものと考えられる。ただし、粗サポニン分画に含まれる成分は、前述の精製サポニン類に限定されるものではない。

以上のことより、薬用人参の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイド Rb<sub>1</sub> と同様に優れた脳細胞・神経細胞保護作用ならびに脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷治療効果を示すことが明らかにされた。従って、本発明の低濃度・低用量の粗サポニン分画、もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが、特願平 10-365560、PCT/JP99/02550、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤) ならびに特願平 11-

243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において本発明者らが記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途を、すべて兼ね備えていると考えられる。すなわち、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめるかもしくはその他のBcl-x<sub>L</sub>蛋白群の発現を調節することにより、神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止するものと考えられる。さらに、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に、神経細胞死を伴うあらゆる脳神経疾病（アルツハイマー病、脳卒中、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、シャイドレージャー病、スフィンゴリピドーシス、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）に効果・効能を示すとされる。

さて、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>は細胞を生かすための最後の砦とも言うべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に、Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめるという前記の推測に基づけば、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが細胞死を伴うあらゆる末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、狭心症、末梢循環不全、褥創、創傷、皮膚潰瘍、皮膚の創傷、外傷、熱傷、放射線障害、アトピー性皮膚炎、老化、紫外線障害、電撃症、脱毛症、乾皮症、花粉症、皮脂欠乏症、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶

反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、消化性潰瘍、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、痔疾、血栓性静脈炎、脾炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症等が含まれる。その他の細胞死を伴う疾患や病態として、成書（今日の治療指針；監修、日野原重明、阿部正和；医学書院；1995）に記載されたすべての器質的疾患や病態が考えられる。また、本発明の低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、加齢に伴う免疫機能低下、皮膚機能低下、循環機能低下、消化機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、健康薬としても使用可能である。さらに、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを化粧品の組成物として利用することにより、加齢に伴う皮膚の老化症状（皮膚の萎縮、白髪、ふけ、皮脂欠乏、角層剥離、角質細胞剥離、脱毛、亀裂、たるみ、かゆみ、かさつき、ひびわれ、そばかす、色素沈着、日焼け、乾燥、しわ、しみ等）の予防・治療・処置にも利用できる。さらに、農作物育成、魚介類の養殖、甲殻類の養殖、ペットの疾病治療、ケミカルピーリング、生花の保存、水栽培、開花時期の延長にも利用できる。

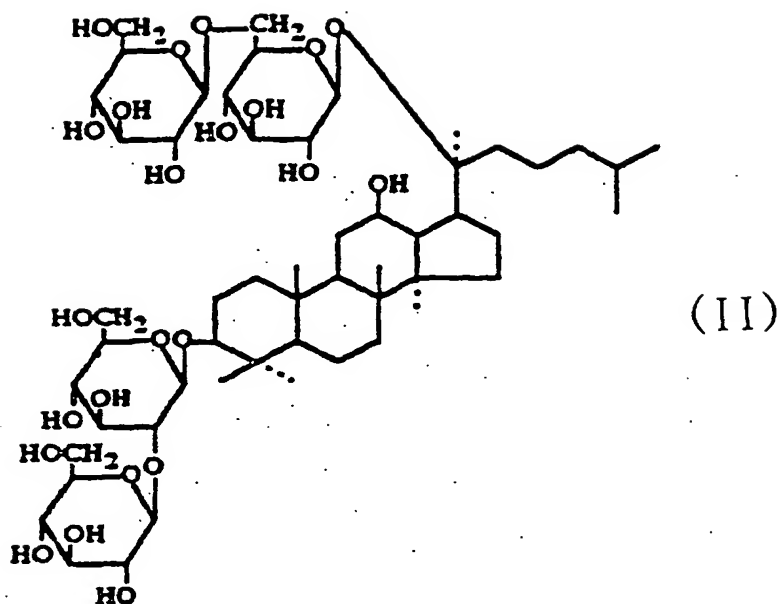
特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドR<sub>b1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）はジンセノサイドR<sub>b1</sub>の少量静脈内持続投与が、脳血管再生・再構築促進作用、神経組織二次変性抑止作用、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑止作用等を介して、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめることを見出した。低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に優れた脊髄損傷治療効果を示すという本実験結果は、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷の治療薬となり得ることを物語っている。すなわち、特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドR<sub>b1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）もしくは特願2000-163026号（ジンセノサイドR<sub>b1</sub>からなる皮膚組織再生促進剤）において、本発明

者ら（阪中、田中）が記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかにも当てはまると言える。もちろん、本発明の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分の投与方法としては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に患部組織における細胞外液濃度が既述のごとく低濃度に維持できるのであれば任意の投与経路が選択できる。具体的には、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。さらに、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの投与方法として、皮下注射、筋肉注射、点眼、点鼻、点耳、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを経口投与剤として使用する時は、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれか単独に投与したのでは効果があまり期待できない場合があるので、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体に粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になるかもしれない。また、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの代謝産物のうち、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかと同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明の低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかと高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のミクロ粒子に粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかをコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。もちろん、粗サポニン分画構成成分のいずれかをを用いてプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択してもよい。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にも低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが有効と思われる。

その他の移植用臓器・組織（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかで浸すか灌流することにより、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、低濃度・低用量の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは輸血用血球成分・血小板の保護・維持、凍結卵子、凍結精子あるいは幹細胞の保護・維持にも有効と思われる。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくは低用量・低濃度の粗サポニン分画からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。おそらくジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又は粗サポニン分画構成成分のいずれかが極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するものと思われるが、このことはジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又は粗サポニン分画構成成分のいずれかが、脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷のためのリード化合物になることを支持している。また、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又は粗サポニン分画構成成分のいずれかをリード化合物として利用することにより、新規の脊髄損傷治療薬が開発されれば、当該新規化合物が脳梗塞や脳卒中に効果・効能を示すことが容易に推定される。もちろん、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又は粗サポニン分画構成成分のいずれかをリード化合物として利用することにより、まず脳梗塞・脳卒中治療用医薬組成物を新規に作成することも可能である。その場合は、逆に当該新規脳梗塞・脳卒中治療用化合物が、脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷治療用医薬組成物にもなると考えられる。さて、そのような新規に作成されるジンセノサイドR b<sub>1</sub>誘導体のうち、脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷治療用医薬組成物、脳細胞保護剤もしくは神経細胞保護剤として実用化される可能性がもっとも高いのが、下記構造式（II）



で示される化合物（ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub>、dihydro-ginsenoside R b<sub>1</sub>）であり、本化合物は、本発明者らが所有している高純度のジンセノサイド R b<sub>1</sub>があれば、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>のダマラン骨格（ステロイド様骨格）に結合した側鎖（カーボンチェーン）の二重結合を還元（すなわち水素添加）することにより容易に作成することができる。

また、第20図に示したような、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>の化学的誘導体もジンセノサイド R b<sub>1</sub>と同様に脳細胞保護作用もしくは神経細胞保護作用を有するものと期待される。第20図はジンセノサイド R b<sub>1</sub>のダマラン骨格の修飾の例を示す。左上の（1）はアセチル化誘導体の例であり、（2）は側鎖の二重結合をジヒドロ化した誘導体の例であり、（3）は側鎖の二重結合を切断して末端をアルデヒド基にした誘導体の例であり、（4）は側鎖の二重結合の先を延長したりカルボキシル基誘導体にした例であり、（5）は側鎖の二重結合を切断してカルボキシル基誘導体にした例である。右側の（6）は前記カルボキシル基誘導体の糖鎖部分を他の誘導体にした例であり、（7）及び（8）も他の糖鎖を有する誘導体の例である。

第20図に示したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の化学的誘導体は、原則としてダマラン骨格（ステロイド様骨格）に結合した側鎖（カーボンチェーン）に任意の修飾を加えたものである。このカーボンチェーンは、粗サポニン分画に含まれる30種類前後の精製サポニンの大半に共通して存在するので（第15図）、もし、粗サポニン分画に含まれるジンセノサイドRb<sub>1</sub>以外の脊髓損傷・神経外傷・頭部外傷治療用成分もしくは神経細胞保護用成分が同定されれば、当該成分もしくは精製サポニンのカーボンチェーンもジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に還元（水素添加）するか第20図に示した要領で修飾することにより、新規脳神経細胞保護用化合物の探索に利用することができる。ただし、リード化合物として利用できる粗サポニン分画の成分は前述の精製サポニンに限定されるものではない。また、粗サポニン分画構成成分をリード化合物として作成できる新規化合物は、前述のダマラン骨格（ステロイド様骨格）側鎖を任意に化学修飾したものに限定されるものではない。

以上の結果から、粗サポニン分画又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が脊髓損傷による神経組織の二次変性を抑止することが発明された。さらに、粗サポニン分画からなる医薬組成物は脊髓損傷・神経外傷・頭部外傷の画期的治療薬となるのみならず、末梢組織の外傷にも効果・効能を示すことが期待される。

このように粗サポニン分画の脊髓損傷・神経外傷治療効果は画期的なものである。粗サポニン分画に含有される成分や精製サポニン（ジンセノサイド類）もしくはそれらの代謝産物をリード化合物として新規脊髓損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、粗サポニン分画に含有される成分や精製サポニンもしくはそれらの代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髓損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

さて、特願平11-340850、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）においては、前述の粗サポニン分画静脈内投与と同様に、本発明者ら（阪中、田中）はラットの下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与を開始した。すなわち、下位

胸髄に圧負荷を加え始めてから、およそ1時間後にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与して、脊髄損傷治療効果を判定したといえる。しかし、一般にヒト脊髄損傷症例では、脊髄損傷発症後2時間以内が非常に重要で、この時間内に何らかの処置を施すことにより患者の予後が改善されると言われている。もっとも、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脊髄損傷治療効果に関する発明がなされるまでは、脊髄損傷発症後1時間前後に静脈内投与することにより、下肢対麻痺をきたした脊髄損傷動物を起立せしめる化合物すら見出されていなかったのが現状であるので、具体的には、前述の“何らかの処置”がどのような処置法や治療法であるのかまったく明らかにはされていない。そこで、本発明者は次に脊髄損傷発症後2時間目よりジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与し、その効果を調べた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ウィスターラット（体重300g程度）の下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷した後にいったん覚醒せしめ、下肢対麻痺をきたしたラットをケージ内に1時間40分放置した。すなわちラットの下位胸髄に20gの圧力を加え始めた時点から、約2時間いかなる処置・治療も施さず脊髄損傷ラットを放置したことになる。その後速やかに左大腿静脈へジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 $\mu$ g）を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 $\mu$ g/日）をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照の脊髄損傷動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水（vehicle、媒体）を投与した。

結果を第21図に示す。第21図は、下肢対麻痺をきたしたラットの経過を示す、図面に代わる写真である。左側中段が下肢対麻痺をきたした直後の写真であり、下段がその2時間後からジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60 $\mu$ g）を投与した場合のラットの写真であり、上段はコントロールとして生理食塩水を投与したラットの写真である、それぞれ左側は1日後、右側は1週間後のものである。

第21図に示すごとく、下位胸髄への圧負荷を開始後2時間を経過した時点よりジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与されたラットは、脊髄損傷当日には下肢の対麻痺をきたしてまったく立ち上がることができず、翌日にもやや下肢対麻痺に改善はみられるものの依然として起立することができなかった。しかし同ラットは、脊髄損傷発症後3～4日目より徐々に下肢の対麻痺が回復し始め、第21図に示

すごとく脊髄損傷後1週間目にはオープンフィールドの壁（高さ8cm）に付きながら起立するようになった。一方、第21図に示すごとく、下位胸髄への圧負荷を開始後2時間を経過した時点より生理食塩水（vehicle、媒体）のみを静脈内投与されたラットは、脊髄損傷後1週間を経過しても下肢の対麻痺はまったく改善しなかった。しかも、生理食塩水のみを静脈内投与された脊髄損傷ラットでは、個体により程度の差はあるものの、第21図に示すごとくしばしば下腹部に褥創が認められた。しかし、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与例では下腹部の褥創はほとんどみられなかった。

以上の実験結果より、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は、脊髄損傷発症後とはもとより、脊髄損傷発症後2時間以上経過したのちに開始されても、優れた治療効果を示すことが発明された。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は明らかに脊髄損傷に伴う褥創にも効果・効能を発揮することが示された。このことは、脊髄損傷のみならず他の神経外傷（頭部外傷、末梢神経障害）、脳卒中、脱髄疾患、神経変性疾患に伴う褥創の予防、治療、処置にもジンセノサイドRb<sub>1</sub>が有効であることを物語っている。従って、脊髄損傷以外の神経外傷、すなわち頭部外傷や末梢神経の外傷・損傷においても、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を傷害発症後2時間以上経過したのちに静脈内投与しても優れた効果を示すと考えられる。

また、脊髄損傷を起こした神経組織では、しばしば当該脊髄組織に浮腫が生じ神経症状（下肢又は上肢の対麻痺、排尿・排便困難等）を悪化せしむることが知られているが、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が優れた脊髄損傷治療効果を示すという本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脊髄組織の浮腫の予防・治療・処置に有用であるということを物語っている。もちろん、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は脊髄損傷に伴う性機能障害、排尿・排便困難、自律神経障害、神経因性膀胱の優れた治療剤とも考えられる。

本発明の実験結果で示したように、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物をリード化合物として新規脊髄損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療

薬の開発を目指すことができる。

また、脊髄損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている (Crowe, M.J. et al., Nature Med. 3, 73-76, 1997 ; Emery, E. et al., J. Neurosurg. 89, 911-920, 1998)。ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内持続投与が顕著に脊髄損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> がオリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髄損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明の低用量・低濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> はオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患 (多発性硬化症、ピンズワンガー病、急性散在性脳脊髄炎、脱髄脳炎、脳の慢性低灌流障害等) の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、低用量・低濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内持続投与が脊髄損傷ラットの両下肢麻痺 (対麻痺) を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織が低用量・低濃度の粗サボニン分画投与により再生することも示している。

一般に脳神経組織内の有髄神経線維において、オリゴデンドロサイトは神経細胞の軸索突起 (axon) を何重にもとりまいて髄鞘 (ミエリン、myelin) を形成することで知られている。また、無髄神経線維においても、オリゴデンドロサイトの突起が神経細胞の軸索突起 (axon) をほぼ一重に取り囲んでいることが知られている。このように、脳神経組織内においては、神経細胞とオリゴデンドロサイトは常時密接な位置関係を保持していると言える。そこで、本発明者らは、神経細胞とオリゴデンドロサイトを共培養して、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> が両細胞の生存を促進するかどうかを調べた。このため、神経細胞は、妊娠 17 日のラット胎仔大脳皮質より分離した。オリゴデンドロサイトは、生直後ラットの前脳より開始した混合脳細胞培養より分離した。神経細胞 50 万個に対し、オリゴデンドロサイト 5 万個を共培養し、この培養系にジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を 1 f g / m l から 10 p g / m l の濃度で 1 % 牛胎仔血清を含む D M E M 中に添加し、5 日間培養した。その後電気泳動サンプルを作成し、培養ウェル中の神経細胞特異タンパク質 M A P 2 とオリゴデンドロサイト特異タンパク質の C N P a s e の存在量をウェ

スタンプロットにより調べた。

結果を第22図に示す。第22図は、神経細胞-オリゴデンドロサイト共培養系に対するジンセノサイドRb<sub>1</sub>の生存促進効果をみたウェスタンプロットの結果を示す図面に代わる写真である。

第22図の上段がMAP2のウェスタンプロットを、第22図の下段がCNPaseのウェスタンプロットをそれぞれ示し、横方向はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の濃度(fg/ml)を示す。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから100fg/mlの濃度で、神経細胞とオリゴデンドロサイトの共培養系に添加すると、MAP2のバンドならびにCNPaseのバンドが、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>非添加例及びジンセノサイドRb<sub>1</sub> 10<sup>-4</sup>fg/ml添加例と比べて、明らかに濃くなっていた。このことは、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから100fg/mlの濃度で添加しておくで、MAP2とCNPaseの存在量が明らかに多くなることを示している。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>により神経細胞ならびにオリゴデンドロサイトの生存が促進されたことになる。このことは、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトの細胞死を伴う疾患(多発性硬化症、ピンスワンガー病等の脱髄をきたす脳神経疾患)の予防・治療・処置に有効であることを強く支持するものである。ちなみにジンセノサイドRb<sub>1</sub>の分子量は約1109.46であるので、1fg/mlのジンセノサイドRb<sub>1</sub>はおよそ0.9fMのジンセノサイドRb<sub>1</sub>に相当すると考えられる。

次に、本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトにおけるBcl-x<sub>L</sub>の発現を増強するかどうかを調べた。そのため、たとえば一次培養ラットオリゴデンドロサイトにジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから10pg/mlの濃度で添加し、6時間培養した後に、総RNAを回収し、Bcl-x<sub>L</sub>のmRNAをRT-PCRにて測定した。RT-PCRの内部標準には、βアクチンmRNAを用いている。また、一部のオリゴデンドロサイトはジンセノサイドRb<sub>1</sub>で処理後にSDS電気泳動サンプルとし、培養ウェル中の抗アポトーシス因子Bcl-x<sub>L</sub>の存在量をイムノブロット(ウェスタンプロット)により検討した。なお、オリゴデンドロサイトは、生直後ラット前脳より開始した混合脳細胞培養より分離した。

結果を第23図に示す。第23図は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>のオリゴデンドロサイトにおけるBcl-x<sub>L</sub>の発現増加の効果をみたイムノプロット（ウェスタンブロット）の結果を示す、図面に代わる写真である。第23図の上段はRT-PCRの結果を、第23図の下段はイムノプロット（ウェスタンブロット）の結果をそれぞれ示す。上段のRT-PCRにおける左側はβアクチンmRNAの場合であり、右側はBcl-x<sub>L</sub>のmRNAの場合である。Rb<sub>1</sub>(-)はジンセノサイドRb<sub>1</sub>不添加例、Rb<sub>1</sub>(+)はジンセノサイドRb<sub>1</sub>を100fg/ml添加した例である。下段の横方向はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の濃度（fg/ml）を示す。

RT-PCRにより、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を100fg/mlの濃度で添加しておくと、オリゴデンドロサイトにおいてBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現が明らかに増強した。また、イムノプロット（ウェスタンブロット）によって、Bcl-x<sub>L</sub>蛋白もジンセノサイドRb<sub>1</sub>の添加により増加することが判明した。本実験結果は、脊髄損傷や脱髄をきたす脳神経疾患において、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が、オリゴデンドロサイトの保護作用を発揮することを強く支持するものである。

特願平10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において、本発明者ら（阪中、田中）は培養神経細胞にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1-100fg/ml前後の濃度で添加しておくと、同細胞におけるBcl-x<sub>L</sub>の発現が上昇することを見出している。そこで本発明者らは次に少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内持続投与した際にも、脳組織においてBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現増加がみられるかどうかを調べた。

このため、たとえば12週齢のSH-SPラット（体重250～300g）を用いた。吸入麻酔下でSH-SPラットのMCAを永久閉塞した直後に、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60μg）を単回静脈内注入し、その後、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を60μg/日の用量で静脈内へ持続投与した。対照のMCA閉塞動物ならびに偽手術動物には、MCA永久閉塞後同量の生理食塩水（vehicle、媒体）のみを静脈内投与した。

結果を第24図に示す。第24図は、生体内におけるジンセノサイドRb<sub>1</sub>のBcl-x<sub>L</sub>の発現増加の効果をみたRT-PCRの結果を示す、図面に代わる写真

である。第24図の上段2種はグループ1の動物群の場合であり、下段2種はグループ2の動物群の場合である。それぞれのグループの上段は $\beta$ アクチンの場合であり、下側はBcl-xLの場合である。Shamは偽手術動物、Rb<sub>1</sub>(-)は生理食塩水投与脳梗塞動物、Rb<sub>1</sub>(+)はジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与脳梗塞動物でMCA永久閉塞後4時間目(Rb<sub>1</sub>(+)の左側)の場合とMCA永久閉塞後6時間目(Rb<sub>1</sub>(+)の右側)の場合を示す。

Group1(グループ1)は偽手術動物、生理食塩水投与MCA永久閉塞動物(MCA永久閉塞後すなわち脳梗塞後4時間目)、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与脳梗塞動物(MCA永久閉塞後4時間目)、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与脳梗塞動物(MCA永久閉塞後6時間目)の動物群を示す。Group2(グループ2)も同様の条件の動物で構成されている。Shamは偽手術動物、Rb<sub>1</sub>(-)は生理食塩水投与脳梗塞動物、Rb<sub>1</sub>(+)はジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与脳梗塞動物を示す。偽手術後、ならびにMCA永久閉塞後4時間目もしくは6時間目に、ラットを抱水クロールにて麻酔し左側大脳皮質(すなわちMCA永久閉塞側の大脳皮質)を取り出したのちに、総RNAを調整してRT-PCRに供した。なお内部標準として $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)のmRNAを用いた。

第24図に示すごとく、Group1、Group2ともに偽手術動物や生理食塩水投与脳梗塞動物に比べて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与例においてMCA永久閉塞後4時間目、6時間目ともに大脳皮質のBcl-xL mRNA発現が明らかに上昇していた。

大脳皮質の神経組織には、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞(アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等が含まれている。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が大脳皮質におけるBcl-xL mRNA発現を促進せしめるという本実験結果は、前述の大脳皮質構成細胞のいずれかがジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与によりBcl-xL mRNA発現を増強することを物語っている。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は細胞の種を超えて、Bcl-xL発現増強作用を示すと考えられた。また、脳梗塞ラットのみならず脊髄損傷ラットにおいても、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の(60  $\mu$ g/日)の静脈内投与が脊髄組織においてBcl-xL mRNAの発現を上昇せしめ

るものと考えられる。さらに、低用量・低濃度の粗サポニン分画の静脈内投与が、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) の静脈内投与と同様に、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという前述の実験結果に基づけば、低用量・低濃度の粗サポニン分画の静脈内投与も脳神経組織におけるBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現を上昇せしめるものと考えられる。

さて、本発明者らはこれまで神経組織や神経組織構成細胞（神経細胞、オリゴデンドロサイト）を用いて、薬用人参（コウジン末）、粗サポニン分画、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能を調べてきたが、次に心臓に対するジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果を検討した。このため、たとえば一次培養心筋細胞をジンセノサイドRb<sub>1</sub>存在下で18時間培養した際の、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAと、Bcl-x<sub>L</sub>タンパク質の発現変動をRT-PCRとイムノブロッティングにより検討した。心筋細胞は、妊娠17日齢のラット胎仔心臓をトリプシンEDTAを用いて細胞分散したものを、10%FCS（牛胎仔血清）を含有するDMEM中で数日間培養したものをを用いた。RT-PCRは、 $\beta$ アクチンmRNAを内部標準として用いた。イムノプロットでは、横紋筋特異的タンパク質であるトロポニンTを内部標準として、Bcl-x<sub>L</sub>タンパク質の発現を検討した。イムノプロットでは、異なるロットの心筋細胞を用いて、同様の実験を10回繰り返し、Bcl-x<sub>L</sub>免疫反応陽性のバンドをデンストメトリーにて解析し、統計学的検討を行った。

結果を第25図に示す。第25図の上段はRT-PCRの結果を示す図面に代わる写真であり、中段はイムノプロット（ウェスタンブロット）の結果を示す図面に代わる写真である。横方向はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の濃度（fg/ml）を示す。

第25図の下段はウェスタンブロットの結果をデンストメトリー解析に供したものを示す。統計解析法はAnova+Fischer's PLSDであり、個数nは10であり、\*印は $p < 0.05$ を、\*\*印は $p < 0.01$ であることを示す。

第25図に示すごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 1 fg/ml - 100 fg/ml存在時に、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現が明らかに上昇した。Bcl-x<sub>L</sub>蛋白レベルでは1 fg/mlから10<sup>4</sup> fg/mlの濃度域でジンセノサイドRb<sub>1</sub>

が有意に Bcl-xL 蛋白の発現を増強せしめた。本実験では、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 10<sup>-4</sup> fg/ml の濃度で Bcl-xL mRNA の発現と Bcl-xL 蛋白の発現に解離が生じているが、Bcl-xL mRNA の発現は、比較的高濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を投与した場合には、投与 18 時間後にはすでにダウンレギュレーションを受けるものと考えられる。

次に本発明者らは、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> が Bcl-xL 蛋白の発現を上昇せしめる濃度域で、実際に心筋細胞の細胞死を抑止できるかどうかを調べた。このために、たとえば一次培養心筋細胞を、グルコース非存在下で培養した際の、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の心筋細胞保護効果を検討した。グルコースを含有しない無血清 DMEM 中にジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を 0 から 1 ng/ml の濃度で添加しておき、心筋細胞を 4 ないし 5 日間培養した。その後電気泳動サンプルを作成し、抗横紋筋特異  $\alpha$  アクチニン抗体を用いてイムノブロッティング（ウェスタンブロット）を行った。

結果を第 26 図に示す。第 26 図の上段は  $\alpha$ -アクチニン ( $\alpha$ -Actinin) のウェスタンブロットの結果を示す図面に代わる写真であり、横方向はジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の濃度 (fg/ml) を示す。第 26 図の下段はウェスタンブロットの結果をデンストメトリー解析したものを、それぞれ示す。統計解析は、ANOVA + Scheffe's post hoc test による。個数 n は 3 であり、\* 印は  $p < 0.05$  を、\*\* 印は  $p < 0.01$  であることを示す。

第 26 図に示すごとく、無グルコース無血清培養液のみで心筋細胞を培養した場合は、培養 4-5 日目にはすでに心筋細胞は消失して  $\alpha$  アクチニンのバンドも検出されなかった。ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を 1 fg/ml から 10<sup>-4</sup> fg/ml の濃度で添加しておいた場合には、拍動を続ける多数の心筋細胞が観察され、イムノブロットにより横紋筋特異的  $\alpha$  アクチニンの有意な存在が認められた。

以上の結果よりジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は、神経細胞に対する場合よりもやや広い濃度域で (0.01 - 10<sup>-4</sup> fg/ml もしくは 1 - 10<sup>-4</sup> fg/ml) 心筋細胞の Bcl-xL 発現を上昇せしめ、心筋細胞を保護する作用を有することが見出された。ところで、本発明者ら (阪中、田中) は特願平 10-365560、PCT/J P 99/02550 (ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保

護剤)において、 $1\text{ fg/ml}$ 、 $100\text{ fg/ml}$ 、 $10^5\text{ fg/ml}$ の濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が、アポトーシス様神経細胞死を抑止するか否かということと、神経細胞のBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現を促進するか否かということを調べた結果、 $1\text{ fg/ml}$ と $100\text{ fg/ml}$ の濃度で有意な効果を得ている。しかし、実際には $10^4\text{ fg/ml}$ の濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が有意に、心筋細胞のBcl-x<sub>L</sub>蛋白発現を上昇せしめ、心筋細胞の細胞死を抑止したので、神経細胞においても同様の濃度域( $1\text{ fg/ml}$ から $10^4\text{ fg/ml}$ )でジンセノサイドRb<sub>1</sub>がBcl-x<sub>L</sub>蛋白の発現を促進し、アポトーシス様神経細胞死を抑止する可能性があるものと考えられる。

$1\sim 10^4\text{ fg/ml}$ という低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が心筋細胞における細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめ、無グルコース条件下の心筋細胞死を抑止するという本実験結果より、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が心筋細胞の細胞死を伴うあらゆる疾病(たとえば心筋梗塞、心筋炎、川崎病、心筋症、心不全、心停止、狭心症等)に効果・効能を示すと考えられる。また、心臓外科手術時に、人工心肺灌流液の中に低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を添加しておくことにより、心筋細胞や心臓をより効果的に保護できると思われる。もちろん、心肺蘇生術を実施する際にも、低用量・低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内へ投与することにより、蘇生後の心筋細胞障害を最小限にくい止めることができる。さらに、低血糖発作に見舞われた患者、もしくは頻回に低血糖発作を起こす恐れがある患者に、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与、挿肛投与、舌下投与もしくは点鼻投与しておけば、より効果的に低血糖による心筋細胞障害を軽減するものと期待される。もちろん、前述の心筋細胞に対する好ましい効果は、低用量・低濃度の粗サポニン分画によっても、もたらされと考えられる。

本発明では、薬用人参(コウジン末)やジンセノサイドRb<sub>1</sub>のBcl-x<sub>L</sub>発現増強作用について記載したが、周知のごとくBcl-2ファミリー蛋白は、Bcl-2、Bcl-x<sub>L</sub>、Bcl-w等の細胞死抑制因子群とBax、Bad、Bid、Bik等の細胞死促進因子から構成されている。これらのBcl-2ファミリー蛋白は臓器特異的ならびに細胞特異的な発現パターンを有することも知られている。従って、神経組織や心筋細胞に対しては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>はB

c1-xLの発現を上昇せしめることが本発明ならびに本発明者ら（阪中、田中）の既出願特許（特願平10-365560、PCT/JP99/02550、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において見出されているが、他の臓器や細胞においては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がBc1-xL以外の細胞死抑制因子の発現を促進するかもしれない。もしくは前記の細胞死促進因子の発現を抑止することもあり得ると考えられる。もちろん、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が神経組織や神経細胞においても、Bc1-xL以外の細胞死抑制因子（たとえばBc1-2やBc1-w）の発現を促進するか、もしくは細胞死促進因子の発現を抑制することも考えられる。

また、細胞死抑制遺伝子産物Bc1-xLは細胞死のシグナル伝達において、プロカパーゼ9、カパーゼ9、プロカパーゼ3やカパーゼ3等の上流に存在するので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がBc1-xLの発現を上昇せしめ、強力に神経細胞死を抑止するという事実は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がカパーゼの活性化をも抑制することを明らかにしている。

さて、本発明の先行出願（特願平11-243378、薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤）において、本発明者らは薬用人参に含有される活性成分の候補物質をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を新規に検索できると記載したが、本発明においてこのことを実証することを試みた。そのために、たとえば、本発明の前記構造式(II)で示されるジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub> (dihydro-ginsenoside Rb<sub>1</sub>)を用いた。ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は本発明者らの知る限り、新規化合物であると考えられるが、本発明者が有している高純度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>をパラジウムチャーコールを触媒として還元（すなわち水素添加）することにより製造することができる。

ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の薬理作用を解析するため、約16週齢の雄性SH-S Pラット（体重300-320g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝(MCA)を凝固・切離した。ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（約6μg）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて24時間静脈内へ持続注入（約6μg/日）した。

なお、MCAを永久閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）には同量の生理食塩水（vehicle、媒体）のみを静脈内投与した。MCA永久閉塞後24時間目に、致死量のペントバルビタールをラットの腹腔内に注入した。同動物が死亡した直後に脳を摘出し、2mmの厚みの前額切片を作成した。同切片を、1%の2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 溶液に30分間37℃で浸漬し、10%ホルマリンにて12時間以上固定した。

結果を、第27図、第28図に示す。第27図は生理食塩水を投与した2例を、第28図はジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与した2例を示す。

第27図に示すごとく、MCA永久閉塞後生理食塩水を投与したラットでは、向かって左側の大脳皮質に、TTCで染色されない白色の脳梗塞病巣が明らかに認められた。一方、第28図に示すごとく、MCA永久閉塞後にジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与したラットでは脳梗塞病巣が顕著に縮小していた。特に、第28図の右側のカラムにした脳においては、脳梗塞病変が著しく縮小し、同病変が大脳皮質のごく表層に局限していた。このことは、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が虚血巣周辺部（ischemic penumbra）のアポトーシス様神経細胞死を抑止するのみならず、虚血巣中心部（ischemic core）の神経細胞や脳細胞の壊死（ネクローシス）をも抑止することがあることを示している。

ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物がMCAを永久閉塞されたSH-SPラットにおいて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様の脳梗塞縮小作用を示すという本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として利用することにより特に低用量・低濃度で作用する新規神経細胞保護剤もしくは新規脳細胞保護剤を作成できることを証明したものである。しかも、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の有効な静脈内投与量は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の有効な静脈内投与量とほぼ一致しているので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様にジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>も低濃度、低用量で優れた神経細胞保護作用、脳細胞保護作用を示すと考えられる。もちろん、特願平10-365560、PCT/JP99/02550（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）において本発明者らが記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、すべてジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>も兼ね備えていると考えられる。すなわち、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>

は、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめ、神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止するものと考えられる。さらに、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に、神経細胞死を伴うあらゆる脳神経疾患（アルツハイマー病、脳卒中、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、シャイドレージャー病、脳腫瘍、中毒性神経疾患、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙攣性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）に効果・効能を示すとされる。

さて、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>は細胞を生かすための最後の砦とも言えるべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>がジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に、Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめるという前記の推測に基づけば、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>が細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、狭心症、末梢循環不全、褥創、皮膚潰瘍、皮膚の創傷、外傷、熱傷、放射線障害、電撃症、老化、紫外線障害、脱毛症、乾皮症、皮脂欠乏症、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、放射線障害、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓性血管炎、消化性潰瘍、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、痔疾、血栓性静脈炎、脾炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症、糖尿病、動脈硬化症等が含まれる。また、本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、加齢に伴う免疫機能低下、循環機能低下、消化機能低下、皮膚機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、健康薬としても使用可能である。さらに、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>を化粧品組成物として利用することにより、加齢に伴う皮膚の老化（皮膚の萎縮、

たるみ、ふけ、かゆみ、白髪、角層剥離、角質細胞剥離、かさつき、ひびわれ、そばかす、色素沈着、日焼け、乾燥、しわ、しみ等）の予防・治療・処置にも利用できる。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は発毛剤、育毛剤、脱毛の進行予防剤としても利用可能である。もちろん、特願2000-163026号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる皮膚組織再生促進剤）に記載されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、すべてジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>にもあてはまる。

特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の少量静脈内持続投与が、脳血管再生・再構築促進作用、神経組織二次変性抑止作用、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑止作用等を介して、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめることを見出した。ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>がジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に優れた脳梗塞治療効果を示すという本実験結果は、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷の治療薬となり得ることを物語っている。すなわち、特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）が記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>にも当てはまると言える。もちろん、本発明のジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与方法としては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に任意の投与経路が選択できる。具体的には、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。さらに、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の投与方法として、皮下注射、筋肉注射、眼軟膏、点眼、点鼻、点耳、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を経口投与剤として使用する時は、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>単独投与では効果があまり期待できない場合があるので、消化管での分解を阻止する担体（シェラック、ゼラチン、油層等）あるいは消化管での吸収を促進する担体にジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になるかもしれない。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の代謝産物のうちジヒド

ロジンセノサイド R b<sub>1</sub>と同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、ジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>の適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明のジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>と高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のマイクロ粒子にジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>をコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。また、ジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>のプロドラッグを作成して、任意の投与経路を選択してもよい。たとえば、ジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>の水酸基をエステル化してプロドラッグを作成し、脳血液関門を通過せしめたのちに、内因性エステラーゼで加水分解して脳内へのジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>移行量を増やすことも可能となる。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にもジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>が有効と思われる。その他の移植用臓器・組織（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度のジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>で浸すか灌流することにより、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、ジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>は輸血用血球成分・血小板の保護・維持、凍結卵子あるいは精子の保護・維持、凍結幹細胞の保護・維持にも有効と思われる。

もちろん、ジヒドロロジンセノサイド R b<sub>1</sub>が、本発明において記載されたロジンセノサイド R b<sub>1</sub>と同様の効果・効能・用途を示すことは、容易に推測される。

以上のコウジン末を用いた実験結果から、コウジン末からなる経口投与用 B c l - x<sub>L</sub>発現増強剤が、高用量では脳血管性痴呆、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、神経変性疾患、脱髄疾患、脳性マヒ、脊髓損傷などの脳・神経疾患の治療、予防、又は処置に有効であることが明らかにされた。

また低用量のコウジン末を経口投与することにより、肝臓・脾臓を始めとする末梢臓器において細胞死抑制遺伝子産物 B c l - x<sub>L</sub>蛋白の発現が増強されることもわかった。従って、低用量のコウジン末経口投与は、細胞死を伴う末梢臓器の疾病（心筋症、心不全、心筋梗塞、心筋炎、肝・腎・心虚血再灌流障害、肝炎、

腎炎、糖尿病、免疫不全病、褥創、皮膚潰瘍、創傷、外傷、放射線障害、紫外線障害等)にも有効と考えられる。ただし、細胞死を伴う末梢臓器や末梢組織の疾患に対するコウジン末経口投与の効果については、少なくとも一部は、本発明者らが把握できない東洋医学関連論文もしくは漢方医学関連論文において、既に記載されている可能性もあることをここに付記しておきたい。

さらに、前述のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた実験結果から、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が、脳浮腫の予防・治療・処置に有効であること、脊髄損傷に伴う褥創に優れた効果を示すこと、脳神経組織のBcl-x<sub>L</sub>発現を増強することが明らかにされた。また、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトの生存を延長し、同細胞のBcl-x<sub>L</sub>発現を上昇せしめること、ならびに心筋細胞の生存を促進し、同細胞のBcl-x<sub>L</sub>発現を上昇せしめることが判明した。それに加えて、低濃度・低用量の粗サポニン分画の静脈内投与が、優れた脳梗塞治療効果、脊髄損傷治療効果を発揮することを証明し、同分画に含有される成分のいずれかが脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷治療用の医薬組成物になることを示した。

最後にジンセノサイドRb<sub>1</sub>の新規還元化合物すなわちジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が、少量静脈内投与によりジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様の優れた脳梗塞治療効果を示すことが判明した。すなわち、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が、本発明者らの既出願特許(特願平10-365560、PCT/JP99/02550; 特願平11-340850、PCT/JP99/06804)に記載されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途と同様の効果・効能・用途を有することが推測された。もちろん、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、これまで他の発明者や研究者により報告されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途をすべて有していると考えられる。ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた本実験より、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として利用することにより、多くの神経細胞保護剤、脳細胞保護剤、脳卒中治療薬、神経変性疾患治療薬、脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷治療薬、細胞保護剤等が開発されることが実証された。

一方、本発明で使用されるコウジン末、低濃度・低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>、低濃度・低用量の粗サポニン分画は副作用の極めて少ない物質として知られて

いる。

本発明は、比較的高用量のコウジン末の経口投与用製剤からなる有効な急性期・慢性期の脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作などに対する、脳・神経疾患の治療、予防剤及び、神経細胞・神経組織保護薬を提供する。すなわち、本発明のコウジン末は脳卒中が疑われる患者に対して、患者の意識と嚥下機能が保持されている限り、在宅でも経口投与可能な薬物である。また、糖尿病、高血圧症、脳動脈硬化症、心房細動、脳動脈瘤等の基礎疾患を有する脳卒中予備軍とも言うべき高齢者もしくは脳卒中の既往を有する患者があらかじめコウジン末を服用しておくこと、万一不幸にして脳卒中発作に見舞われても、コウジン末を服用しつづけることにより脳卒中病巣や高次神経機能障害が、コウジン末非服用患者に比べて著しく抑制される。

また、本発明のコウジン末を比較的高用量経口投与することにより神経組織における細胞死抑制遺伝子産物すなわち Bcl-2 蛋白の発現が促進されること、ならびに比較的高用量のコウジン末経口投与が虚血巣周辺部（ischemic penumbra）におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することから判断すれば、本発明の比較的高用量のコウジン末からなる医薬組成物はアポトーシス様神経細胞死もしくはアポトーシスを伴う一次性・二次性神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙攣性対麻痺、脳腫瘍、脳炎、アルコール中毒、中毒性神経疾患、スフィンゴリピドーシス、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）などにも有効であるとされる。さらに本発明のコウジン末は、加齢に伴う脳神経細胞死に起因する諸症状（記憶力減退、振戦、筋力低下、作業能力低下、思考力低下、見当識減退、計算力低下、学習能力低下、意欲低下、動機付け低下、認知機能低下、そしゃく機能低下、言語機能低下、判断能力低下ならびにその他

の高次脳神経機能低下)を改善する目的で、健康食品、健康薬(OTC製剤)としても使用可能である。また、本発明の医薬組成物は副作用がほとんどなく、安全性の高い薬物を提供するものである。

さて、細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> は細胞を生かすための最後の砦とも言えるべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低用量のコウジン末経口投与が肝臓・脾臓等の末梢臓器における Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現量を増加させるという本実験結果は、低用量のコウジン末が細胞死を伴うあらゆる末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、狭心症、末梢循環不全、褥創、創傷、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、放射線障害、紫外線障害、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、糖尿病、レイノー症候群、血栓性静脈炎、脾炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症等が含まれる。その他の細胞死を伴う疾患や病態については、成書(今日の治療指針; 監修、日野原重明、阿部正和; 医学書院; 1995)に記載されているが、これらの疾患や病態の予防・治療・処置にコウジン末が有用である。なお、広義には褥創、皮膚潰瘍、熱傷、凍傷なども創傷に含まれる。また、本発明のコウジン末は、加齢に伴う免疫機能低下、循環機能低下、消化機能低下、皮膚機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、健康薬としても使用可能である。コウジン末はヒトのみならずペットや家畜の疾患の予防・治療・処置にも利用できる。さらに海産物(魚介類、甲殻類、ウナギ、アナゴ等)の養殖や農産物栽培にも利用される。この場合コウジン末は、海洋資源や農作物を内分泌攪乱物質、毒素、外傷、微生物、バイオハザード等から守る。

さらに、コウジン末から抽出した成分(紅蔘エキス(コウジンエキス)、粗サポニン分画、各種精製サポニン、ジンセノサイド類、非サポニン分画)及びそれらの代謝産物もしくは化学的誘導体も、コウジン末と同様の効果・効能を示すものと期待される。

また、コウジン末の脳細胞（神経細胞、グリア細胞等）保護成分をリード化合物として、新規細胞保護剤を開発することが可能になるのみならず、コウジン末の脳細胞保護成分の標的分子あるいは受容体を同定することにより、さらにそれらの機能を修飾・調節する新規化合物を合成することができる。これらコウジン末中の脳細胞保護成分の候補として、薬用人参の粗サポニン分画成分、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を始めとする精製サポニン、薬用人参の非サポニン分画及びそれらの代謝産物が考えられることは“発明の詳細な説明”で記述した通りである。薬用人参中に含まれる精製サポニンやそれらの代謝産物を部分的に記述した文献として、庄司の著書（庄司順三、薬用人参サポニンの化学、薬用人参’95、熊谷朗編、pp 251-261）と小橋の著書（小橋恭一ら、薬用人参の真の活性物質は？、一消化管で和漢薬成分はすでに変化している一、薬用人参’95、熊谷朗編、pp 213-221）があげられる。従って、本発明は上述のごとく細胞死を伴うあらゆる疾病の予防・治療・処置剤を開発する上で必須のものとなる。

さらに、コウジン末中の脳細胞保護成分、代謝産物あるいはコウジン末（薬用人参）そのものの細胞保護機構を解析することにより、細胞内情報伝達分子のうち、どの分子群が細胞の生死に関与するかが明らかにされ、それらの分子群の機能を促進または阻害する新規化合物を合成すれば、細胞死を伴う疾病のみならず悪性腫瘍の予防・治療・処置にも利用しうる薬剤が開発されるものと思われる。

一方、本発明ではジンセノサイドRb<sub>1</sub>が優れた脳浮腫の予防・治療・処置剤となることが見出された。一般に、脳浮腫もしくは神経組織の浮腫という病態は脳出血、脳梗塞、脳塞栓、クモ膜下出血、頭部外傷、脳腫瘍、脳炎、重金属中毒、神経外傷、脊髓損傷、けいれん発作時、けいれん発作後、脳神経外科手術中、脳神経外科手術前後、脊椎外科手術中、脊椎外科手術前後、心停止もしくは呼吸停止後に蘇生した際、等においてしばしば出現し、患者の生命予後や神経症状に悪影響を与えることが知られている。従って、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が脳梗塞（脳塞栓）発症後の脳浮腫を治療するということを見出した本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が前述の疾病、疾患、症状、症候に伴う脳神経組織の浮腫の予防・治療・処置にも有用であることを物語っている。

さらに、生体組織の浮腫という病態は、脳血管が永久閉塞した脳組織のみなら

ず、末梢の血管が閉塞した場合や末梢臓器・組織の血流が障害された場合にも、生じることが知られている。従って、脳血管（MCA）が永久閉塞した後に少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与して脳浮腫が改善・治療されたという本実験結果に基づけば、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は末梢組織や末梢臓器の循環障害（たとえば大動脈炎症候群、膠原病、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、血栓性静脈炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、網膜中心動静脈閉塞症、急性末梢循環不全、ショック、レイノー病、レイノー症候群、痔疾、心筋梗塞、褥創、末梢循環不全、狭心症、肝・腎・心虚血再灌流障害等）に効能を示すと考えられる。もちろん、前記の疾病のうち痔疾や褥創に伴う病変組織の浮腫に対しては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を適当な基剤に混入した上で外用塗布、外用噴霧もしくは挿肛投与してもよい。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、患部組織における細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下に維持できるのであれば、静脈内投与に限らず既述のごとく任意の投与経路が選択できる。

また、本発明では、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が脊髄損傷に伴う褥創にも効果・効能を発揮することが示された。このことは脊髄損傷のみならず他の神経外傷、末梢神経障害、末梢神経痛、末梢神経麻痺、脳卒中、神経変性疾患、脱髄疾患に伴う褥創にも、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が有用であることを物語っている。もちろん、前記の脳・神経疾患の一次病変に対しても、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が優れた効果・効能を示すことは、本発明者らが、すでに明らかにしている。

また、脊髄損傷を起こした神経組織では、しばしば当該脊髄組織に浮腫が生じ、神経症状（上肢または下肢の対麻痺、排尿・排便困難、神経因性膀胱）をも悪化せしめることが知られているが、低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与が優れた脊髄損傷治療効果を示すという本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が脊髄組織の浮腫の予防・処置・治療に有用であるのみならず、自律神経障害、排尿・排便困難や神経因性膀胱の予防・処置・治療にも有用であることを物語っている。

さらに低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、オリゴデンドロサイトならびに心筋細

胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を増強し、同細胞の生存を促進するので、低用量のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内投与、静脈内持続投与、点鼻投与、舌下投与もしくは挿肛投与等は多発性硬化症、ビンスワンガー病、白質脳炎等の脱髄疾患、脳の慢性低灌流障害、心筋梗塞、心不全、心筋症、心停止、狭心症、心肺蘇生術中、心肺蘇生術前後、心臓外科手術中、心臓外科手術前後、等に有効と考えられる。

ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は前述のごとく医薬組成物として有用であるのみならず、あらゆる細胞のアポトーシス様細胞死やアポトーシスを抑止するので、生体の老化を防ぐための健康薬もしくは化粧品の組成物としても使用可能である。特に皮膚局所でのジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下、好ましくは 10 pg/ml 以下、より好ましくは 100 fg/ml 以下となるように、あらゆる化粧品、たとえば化粧水（スキンローション）、乳液（ミルクローション）、ファンデーション、コールドクリーム、クレンジングクリーム、洗顔フォーム、ナイトクリーム、美白クリーム、おしろい、うがい薬、洗眼液、洗顔液、口紅、リップクリーム、下地クリーム（メイクアップベース）、UVリキッドファンデーション、パウダーファンデーション等の中に微量のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を混入しておけば、加齢に伴う皮膚の老化症状（紫外線障害、しみ、しわ、そばかす、かさつき、ひびわれ、たるみ、かゆみ、日焼け等）を防ぐ上で極めて有用であると考えられる。もちろん、低用量・低濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は脱毛剤、育毛剤、脱毛の悪化予防剤としても使用可能である。

ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の Bcl-x<sub>L</sub> 発現増強作用は、神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、神経幹細胞等を含めてあらゆる細胞において認められるので、この意味でジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は低用量・低濃度で優れた効果を発揮する細胞保護剤と考えられる。従って、低用量・低濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は中枢神経組織のみならず末梢組織・末梢臓器においても、細胞死を伴うあらゆる疾患、症候、症状に極めて有用と考えられる。また、低用量・低濃度のジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は癌患者や肉腫患者においても、腫瘍細胞に浸潤された健常組織の正常細胞を保護することにより、同患者の QOL 改善や延命に役立つと考えられる。

また、本発明はジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として使用することにより、新規の有用な細胞保護剤ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が作成できることを見出したものである。このことは、薬用人蔘に含有される他の成分をもリード化合物として利用することにより、新規に有用な医薬組成物ならびに健康薬、健康食品等を開発できることを物語っている。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、低用量の粗サポニン分画からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果はジンセノサイドRb<sub>1</sub>と比べて遜色ないくらい優れたものと考えられる。従って粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかもしくはそれらの代謝産物が極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するものと思われるが、このことは粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかもしくはそれらの代謝産物が脊髄損傷・神経外傷治療のためのリード化合物になり得ることも支持している。本実験結果は、さらに粗サポニン分画に含有される精製サポニン（第15図）のいずれかが脊髄損傷後の神経組織二次変性をも抑止することを支持している。なお、本実験では、オタネニンジン（*Panax ginseng* C.A. Meyer）の粗サポニン分画を用いたが、その他の薬用人蔘（たとえば三七人蔘、人蔘田七、ヒマラヤ人蔘、アメリカ人蔘、チクセツニンジン等）の粗サポニン分画を用いても同様の結果が得られると考えられる。従って、前述の薬用人蔘の粗サポニン分画に含有される成分のいずれかが脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷の予防・治療・処置に有用であると考えられる。

また、周知のごとく神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので低用量の粗サポニン分画からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、低用量の粗サポニン分画が中枢神経組織以外の組織すなわち末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。

また、脊髄損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている（Crowe, M.J. et al., *Nature Med.* 3, 73-76, 1997; Emery, E. et al., *J. Neurosurg.* 89, 911-920, 1998）。粗サポニン分画の静脈内投与が顕著に脊髄損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかがオリゴデンドロサイトのア

ポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髄損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明の低濃度・低用量の粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかはオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患（多発性硬化症、ピンスワンガー病、脳の慢性低灌流障害、白質脳炎等）の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、粗サポニン分画の静脈内投与が脊髄損傷ラットの両下肢麻痺（対麻痺）を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織が粗サポニン分画投与により再生することも示唆している。

また、脊髄損傷を起こした神経組織では、しばしば当該脊髄組織に浮腫が生じ神経症状（下肢の対麻痺、排尿・排便困難、神経因性膀胱等）を悪化せしむると言われているが、低用量の粗サポニン分画の静脈内投与が優れた脊髄損傷治療効果を示すという本実験結果は、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画に含有される精製サポニンのいずれかが脊髄組織の浮腫ならびに脊髄損傷に伴う排尿・排便困難・神経因性膀胱の予防・治療・処置に有用であることを物語っている。

さらに本発明では、粗サポニン分画又はその塩を含有している静脈内投与用製剤が脊髄損傷による神経組織の二次変性を抑止することが発明された。さらに、低用量・低濃度の粗サポニン分画からなる医薬組成物は脊髄損傷・神経外傷・頭部外傷の画期的治療薬となるのみならず、末梢組織の外傷にも効果・効能を示すことが期待される。

このように低用量・低濃度の粗サポニン分画の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、粗サポニン分画に含有される成分や精製サポニンもしくはそれらの代謝産物をリード化合物として新規脊髄損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、粗サポニン分画に含有される成分や精製サポニンもしくはそれらの代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

本発明では、薬用人参の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが低用量・低濃度でジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に優れた脳細胞・神経細胞保護作用ならびに脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷治療効果を示すことが明らかに

された。従って、本発明の低用量・低濃度の粗サポニン分画、もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが、特願平10-365560、PCT/JP99/02550、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)ならびに特願平11-243378、PCT/JP99/06804 (ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤)もしくは特願2000-163026号 (ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる皮膚組織再生促進剤)において本発明者らが記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途を、すべて兼ね備えていると考えられる。すなわち、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめ、神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止するものと考えられる。さらに、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に、神経細胞死を伴うあらゆる脳神経疾病 (アルツハイマー病、脳卒中、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等)に効果・効能を示すとされる。

さて、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>は細胞を生かすための最後の砦とも言うべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に、Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめるという推測に基づけば、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、

狭心症、末梢循環不全、褥創、皮膚潰瘍、皮膚の創傷、外傷、熱傷、放射線障害、老化、紫外線障害、電撃症、脱毛症、乾皮症、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、消化性潰瘍、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、痔疾、血栓性静脈炎、腓炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症等が含まれる。また、本発明の低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは、加齢に伴う免疫機能低下、循環機能低下、消化機能低下、皮膚機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、健康薬としても使用可能である。さらに、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかをジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様にあらゆる化粧品の組成物として利用することにより、皮膚の老化症状（紫外線障害、しわ、しみ、日焼け等）の予防・治療・処置にも利用できる。また、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくはその成分は、癌や肉腫を有する患者においても腫瘍細胞に浸潤された健常組織の正常細胞を保護することにより、同患者のQOL改善や延命に役立つと考えられる。

特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の少量静脈内持続投与が、脳血管再生・再構築促進作用、神経組織二次変性抑止作用、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑止作用等を介して、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめることを見出した。低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に優れた脊髄損傷治療効果を示すという本発明の実験結果は、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷の治療薬となり得ることを物語っている。すなわち、特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）が記載したジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかにも当ては

まると言える。もちろん、本発明の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分の投与方法としては、患部における粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分の濃度を既述のごとく低濃度域に維持できるのであれば、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様に任意の投与経路が選択できる。具体的には、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。さらに、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの投与方法として、皮下注射、筋肉注射、点眼、点鼻、点耳、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを経口投与剤として使用する時は、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを単独に投与したのでは効果があまり期待できない場合があるので、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体に粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかを混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になるかもしれない。また、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの代謝産物のうち、粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかと同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかの適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかと高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のミクロ粒子に粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかをコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。もちろん、粗サポニン分画構成成分のいずれかをを用いてプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択してもよい。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にも低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかが有効と思われる。その他の移植用臓器（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度の粗サポニン分画もしくは粗

サポニン分画構成成分のいずれかで浸すか灌流することにより、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、低用量・低濃度の粗サポニン分画もしくは粗サポニン分画構成成分のいずれかは輸血用血球成分・血小板・幹細胞（ES細胞）・神経幹細胞等の保護・維持、凍結卵子あるいは精子の保護・維持にも有効と思われる。

本発明においてジンセノサイドRb<sub>1</sub>の新規還元化合物すなわちジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が、少量静脈内投与によりジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様の優れた脳梗塞治療効果を示すことが判明した。すなわち、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>が、本発明者らの既出願特許（特願平10-365560、PCT/JP99/02550；特願平11-340850、PCT/JP99/06804）に記載されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能・用途と同様の効果・効能・用途を有することが推測された。ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を用いた本実験より、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として利用することにより、多くの神経細胞保護剤、脳細胞保護剤、脳卒中治療薬、神経変性疾患治療薬、脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷治療薬、細胞保護剤等が開発されることが実証されたわけである。薬用人参に含まれる多くの精製サポニンは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様にダマラン骨格（ステロイド様骨格）に側鎖（カーボンチェーン）が結合するという共通の化学構造を有している（第15図参照）。従って、薬用人参に含まれるジンセノサイドRb<sub>1</sub>以外の精製サポニンについても、側鎖（カーボンチェーン）の二重結合を還元することにより、当該精製サポニンと同様の薬理作用・効果・効能・用途を有する新規化合物が作成できる。

ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物がMCAを永久閉塞されたSH-SPラットにおいて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様の脳梗塞縮小作用を示すという本実験結果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をリード化合物として利用することにより新規神経細胞保護剤もしくは新規脳細胞保護剤を作成できることを証明したものである。しかも、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の有効な静脈内投与量は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の有効な静脈内投与量とほぼ一致しているので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>と同様にジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>も低濃度、低用量で優れた神経細胞保護作用、脳細胞保護作用を示すと考えられる。もちろん、特願平10-36

5560、PCT/J P 99/02550、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)において本発明者らが記載したジンセノサイドR<sub>b1</sub>の効果・効能・用途は、すべてジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>も兼ね備えていると考えられる。すなわち、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめ、神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止するものと考えられる。さらに、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>は、ジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に、神経細胞死を伴うあらゆる脳神経疾患(アルツハイマー病、脳卒中、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞踏病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、末梢神経麻痺、末梢神経痛、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等)に効果・効能を示すとされる。

さて、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>は細胞を生かすための最後の砦とも言うべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>がジンセノサイドR<sub>b1</sub>と同様に、Bcl-x<sub>L</sub>の発現を上昇せしめるという前記の推測に基づけば、ジヒドロジンセノサイドR<sub>b1</sub>が細胞死を伴うあらゆる末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、狭心症、末梢循環不全、褥創、皮膚潰瘍、皮膚の創傷、外傷、熱傷、放射線障害、老化、紫外線障害、電撃症、脱毛症、乾皮症、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、消化性潰瘍、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、痔疾、血栓性静脈炎、肺炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症等が含まれる。その他の細胞死を伴う疾患や病態に

については、成書（今日の治療指針；監修、日野原重明、阿部正和；医学書院；1995）に記載されているので本明細書では割愛する。また、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>は癌患者や肉腫の患者においても、腫瘍細胞に浸潤された健常組織の正常細胞を保護することにより、同患者のQOL改善や延命に役立つと考えられる。

また、本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>は、加齢に伴う免疫機能低下、循環機能低下、皮膚機能低下、消化機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、ジンセノサイドR<sub>1</sub>と同様に健康薬としても使用可能である。さらに、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>をジンセノサイドR<sub>1</sub>と同様にあらゆる化粧品の組成物として利用することにより、皮膚の老化症状（萎縮、白髪、ふけ、角層剥離、角質細胞剥離、皮脂欠乏、たるみ、かゆみ、かさつき、ひびわれ、そばかす、色素沈着、乾燥、しわ、しみ、日焼け等）の予防・治療・処置にも利用できる。またジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>はケミカルピーリングにも利用できる。ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>は発毛剤、育毛剤、脱毛の悪化予防剤としても使用可能である。

特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドR<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、ジンセノサイドR<sub>1</sub>の少量静脈内持続投与が、脳血管再生・再構築促進作用、神経組織二次変性抑止作用、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑止作用等を介して、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめることを見出した。ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>がジンセノサイドR<sub>1</sub>と同様に優れた脳梗塞治療効果を示すという本実験結果は、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>が脊髄損傷・頭部外傷・神経外傷の治療薬となり得ることを物語っている。

すなわち、特願平11-243378、PCT/JP99/06804（ジンセノサイドR<sub>1</sub>からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤）において、本発明者ら（阪中、田中）が記載したジンセノサイドR<sub>1</sub>の効果・効能・用途は、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>にも当てはまると言える。もちろん、本発明のジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>の投与方法としては、ジンセノサイドR<sub>1</sub>と同様に任意の投与経路が選択できる。具体的には、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>は静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤もしくは病変部局所噴霧剤としても使用可能である。さらに、ジヒドロジンセノサイドR<sub>1</sub>の

投与方法として、皮下注射、筋肉注射、点眼、眼軟膏、点鼻、点耳、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>を経口投与剤として使用する時は、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>単独投与では効果があまり期待できない場合があるので、消化管での分解を阻止する担体（シェラック、ゼラチン、油層等）あるいは消化管での吸収を促進する担体にジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>を混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になるかもしれない。また、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>の代謝産物のうちジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>と同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>の適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明のジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>と高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のミクロ粒子にジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>をコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にもジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>が有効と思われる。その他の移植用臓器・組織（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度のジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>で浸すか灌流することにより、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>は輸血用血球成分・血小板・幹細胞（ES細胞）・神経幹細胞等の保護・維持、凍結卵子、凍結精子、凍結細胞、凍結組織の保護・維持にもジンセノサイドR b<sub>1</sub>と同様に有用であると考えられる。

## 実施例

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

### 実施例 1（コウジン末の脳梗塞前後経口投与実験）

12～13週齢の雄性SH-S Pラット（体重250～300g）を使用した。

同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝(MCA)を発明者らの論文に記載した方法を用いて吸入麻酔下で凝固、切離した(Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)。コウジン末を蒸留水に混入し、MCA永久閉塞前1週間、MCA永久閉塞後32日間、1日単回経口投与した(0.6 g/kg/日、0.75 g/kg/日、0.9 g/kg/日、または1.2 g/kg/日 1各群 n = 5 - 8)。

なお、MCAを閉塞した対照動物(虚血コントロール動物)と、偽手術をした動物には同量の蒸留水のみを経口投与した。

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って(Zang, B., et al., J Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第1図に示す。第1図の上側は2週目の結果であり、同下側は4週目の結果である。また第1図中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末0.6 g/kg/日投与虚血群、黒四角印はコウジン末0.75 g/kg/日投与虚血群、白三角印はコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群、黒三角印はコウジン末1.2 g/kg/日投与虚血群を示す。

第1図のごとくMCA永久閉塞後(脳梗塞後)の場所学習障害が、蒸留水投与虚血群に比べて、コウジン末0.75 g/kg～1.2 g/kg/日投与虚血群で有意に改善された。特にコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群でもっとも良好な効果がみられた。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA + FisherのPLSDによっている。なお、SH-SPラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左

大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率（％）を算出した。その結果を第2図に示す。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

第2図に示されるごとく、コウジン末0.75～1.2 g/kg/日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。特にコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群で、最も効果が強く、大脳皮質梗塞比率の平均値が蒸留水投与虚血群の2分の1以下に減少していた。このことから、実際の脳梗塞体積は、コウジン末0.9 g/kg/日の経口投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

第3図上段に蒸留水投与虚血群の脳梗塞巣（4例）、第3図下段にコウジン末0.9 g/kg/日投与虚血群の脳梗塞巣（4例）を示す。

また第4図に本実験結果をまとめた模式図を示す。蒸留水投与虚血群では脳梗塞病巣部が大きく脳浮腫もみられるが、コウジン末投与虚血群においては脳梗塞病巣部が縮小して脳浮腫も軽減しており、この結果水迷路テストにおいて目的のプラットホームに短時間で到達している。

#### 実施例2（コウジン末の脳梗塞後経口投与実験）

12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300 g）の左中大脳動脈皮質（MCA）を吸入麻酔下で凝固・切離した後に、コウジン末を0.9 g/kg/日の用量で1日単回32日間経口投与した（n=7）。なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）には、蒸留水のみを投与した（n=8）。

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って（Zang, B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998）、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第5図を示す。第5図の上段は2週目の結果であり、同下段は4週目の結果である。また第5図の白丸印は蒸留水投与虚血群（n=8）、黒四角印

はコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群 (n = 8) を示す。参考として、第 1 図で用いた偽手術群の実験値を黒丸印で示す。

第 5 図のごとく MCA 永久閉塞後 (脳梗塞後) の場所学習障害が、コウジン末 0.9 g/kg/日の虚血後経口投与で蒸留水注入虚血群に比べて有意に改善された。特に、MCA 閉塞後 4 週目に良好な効果がみられた。データは平均値 ± 標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。

4 週目の水迷路テスト終了後に、SH-SP ラットを抱水クロラルにて麻酔し、4% パラホルムアルデヒドを含有する 0.1 モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率 (%) を算出した。その結果を第 6 図に示す。データは平均値 ± 標準誤差で示されており、統計解析法は Mann-Whitney U テストによっている。

第 6 図に示されるごとく、コウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。

### 実施例 3 (高用量コウジン末による神経組織内 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白発現増強作用解析実験)

コウジン末の経口投与が神経組織における Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現を増加させるかどうか、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べた。本発明者らの既発表の論文において (Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)、本発明者らは一過性前脳虚血後の海馬 CA1 領域において Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現量を調べる実験系を確立しているので、この系を用いてコウジン末経口投与の効果を検討した。

ところで、第 7 図に示すように、スナネズミに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 1 週間前より 1 日単回、7 日間コウジン末を 0.9 g/kg/日又は 1.5 g/kg/日の用量で経口投与しておく、蒸留水投与虚血群に比べて海馬 CA1 領域の神経細胞死が有意に予防され、受動的回避学習実験の反応潜時も延長す

ることを、本発明者の1人(阪中)はすでに論文として発表している(Wen, T.-C., et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)。特に、コウジン末1.5 g/kg/日投与虚血群で0.9 g/kg/日投与虚血群よりも良好な効果が見られるので、本実験ではコウジン末を1.5 g/kg/日の用量で、5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回7日間経口投与し、5分間虚血後さらにコウジン末を経口投与した(n=4)。最後のコウジン末投与から24時間目に海馬CA1領域の組織を採取した。その後電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。泳動により分離された蛋白をさらにニトロセルロース膜に転写し、抗Bcl-xL蛋白抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。偽手術動物(n=4)ならびに5分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物(虚血コントロール動物、n=4)には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、1.5 g/kg/日という高用量のコウジン末経口投与が、末梢臓器のBcl-xL蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。以上の実験手順の詳細は発明者らの既報(Wen, T.-C., et al., *J. Exp. Med.*, 188, 635-649, 1998)に記述されている。結果を第8図に示す。

また、抗Bcl-xL蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した。結果を第9図に示す。

第8図に示すごとく、コウジン末を1.5 g/kg/日の用量でスナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回、7日間経口投与し虚血負荷直後にも同量のコウジン末を経口投与すると、24時間後海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白発現量は、偽手術群ならびに蒸留水投与虚血群に比べて、全例で増加していた。この抗Bcl-xL蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果、第9図に示すごとく、コウジン末の経口投与が海馬CA1領域におけるBcl-xL蛋白発現量を有意に増加させることが判明した。しかし、このような高用量のコウジン末を経口投与しても肝臓や脾臓におけるBcl-xL蛋白発現量は増加しなかった。統計解析法はANOVA+Scheffeのpost hoc testによっている。

#### 実施例 4（低用量コウジン末経口投与による肝臓・脾臓内 B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現増強作用解析実験）

発明者らは次に、低用量のコウジン末を 1 週間よりも長期にわたり経口投与すれば海馬 C A 1 領域における B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現量が増加するかどうか調べた。このため、たとえば 200 mg / kg / 日の用量で、スナネズミに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 4 週間前より 1 日単回経口投与し、5 分間虚血直後にさらに単回経口投与した（n = 4）。24 時間後に海馬 C A 1 領域を採取し、第 8 図に示した実験同様抗 B c l - x<sub>L</sub> 蛋白抗体によるウエスタンブロッティングを実施した。偽手術動物ならびに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物）には、同量の蒸留水のみを経口投与した（各群 n = 4）。また、200 mg / kg / 日のコウジン末経口投与が、末梢臓器の B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した（各群 n = 4）。

しかしながらコウジン末を 200 mg / kg / 日の用量で 4 週間経口投与しても海馬 C A 1 領域における B c l - x<sub>L</sub> 蛋白の発現量には有意な増加は認められなかった。また、200 mg / kg / 日の用量でコウジン末を 5 分虚血前 4 週間、1 日単回経口投与し、さらに 5 分虚血後同じ用量で一週間コウジン末を経口投与しても、スナネズミの受動的回避学習障害ならびに海馬 C A 1 領域の神経細胞死は軽減されなかった。このことは低用量のコウジン末経口投与により B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現量の増加が誘導されなければ、神経細胞保護効果も見られないことを物語っている。

前述のごとく、200 mg / kg / 日の用量でコウジン末を、スナネズミに脳虚血を負荷する前に 4 週間経口投与しても、海馬 C A 1 領域での B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現量は増加しなかったが同量のコウジン末を同様のスケジュールで経口投与すると、第 10 図及び第 11 図に示すごとく肝臓や脾臓における B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現量が有意に増加した。統計解析法は A N O V A + S c h e f f e の post hoc t est によっている。

#### 実施例 5（高用量コウジン末の経口投与による海馬 C A 1 神経細胞の長期変性抑

止効果)

スナネズミの脳温を  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  に維持した状態で3分間両側総頸動脈の血流を遮断し、再灌流させると、1週間後に海馬CA1領域の神経細胞が約半数死に至ることを発明者の一人はすでに発表している (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. USA, 95, 4635-4640, 1998)。しかも、この時点で生存していると考えられる海馬CA1領域の神経細胞において、アポトーシス様細胞死の指標である核の断片化がさらに進行中であることが、TUNEL染色法により発明者らは確認している (Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。従って3分間の一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では、5分間虚血を負荷した場合と異なり、虚血後1週目以降も神経細胞変性が進行することが明らかにされている。本発明者らは、このように比較的長期にわたって神経細胞死が進行する3分間の一過性前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を虚血後4週間経口投与したときの効果を調べた。

発明者らの方法に準じて (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)、吸入麻酔下でスナネズミの脳温を  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  に維持しながら両側総頸動脈血流を3分間遮断した。同動物が麻酔から覚醒したのちに、コウジン末を  $1.5\text{ g/kg/日}$  の用量で1日単回28日間経口投与した ( $n=11$ )。偽手術動物 ( $n=12$ ) と3分間の前脳虚血を負荷した対照動物 (虚血コントロール動物) ( $n=8$ ) には、同量の蒸留水のみを経口投与した。その後、ステップダウン型受動的回避学習実験を実施して、同動物をペントバルビタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒド及び2.5%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定した。脳を摘出したのち、パラフィンに包埋し、 $5\mu\text{m}$ の厚みのパラフィン切片を作成した。各動物の海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を発明者らの方法により計測した (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360,

1998)。以下に前掲の論文で記述したステップダウン型受動的回避学習実験の概略を記述する。

3分虚血後28日目にスナネズミを受動的回避学習実験装置の安全域（プラットフォーム）に置くと、当初スナネズミは何度か下のグリッド部に降りるが、その都度電撃刺激を受けて安全域に戻る。5分間の訓練施行中に、多くのスナネズミは安全域をとどまるようになる。24時間後、グリッド部の電源を切った状態で、再びスナネズミを安全域に置き、グリッド部に降りるまでの時間（反応潜時）を測定して、同動物の学習能力の指標とした。

結果を第12図、第13図に示す。第12図の（A）は受動的回避学習実験の反応潜時を、第12図の（B）は海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を示す。第12図（A）に示すごとく、コウジン末を3分虚血後4週間経口投与すると、受動的回避学習実験の反応潜時が蒸留水投与虚血群に比べて有意に延長した。また、第12図（B）に示すごとくコウジン末の経口投与により、海馬CA1領域の神経細胞密度も蒸留水投与虚血群に比べて有意に増加していた。

第13図の（A）は偽手術動物、（B）は蒸留水投与虚血動物、（C）はコウジン末投与虚血動物の、海馬CA1領域光学顕微鏡をそれぞれ示す。第13図に示すごとく、偽手術動物（A）に比べて、蒸留水投与虚血動物（B）では3分虚血後、1週間目以後も神経細胞がさらに変性脱落し（死に至り）、虚血後1週間に生存していた正常の2分の1程度の海馬CA1神経細胞が、虚血後28日目にはさらに正常の4分の1前後まで減少することがわかった。しかし、コウジン末を3分虚血負荷後から28日間経口投与しておく（C）、虚血後一週間目から28日目までに起こる神経細胞死が有意に抑止されることが判明した。

#### 実施例6（コウジン末経口投与による舞蹈病の治療、予防及び処置）

舞蹈病（ハンチントン病）は神経変性疾患の中でも代表的な単一遺伝子病として知られており、ポリグルタミンをコードするCAGのくり返し配列が病因であると考えられているが、その治療法はいまだ開発されていない。舞蹈病の責任遺伝子であるミュータントハンチンチン（mutant huntingtin）を線状体由来の培養神経細胞に導入（transfection）すると、同細胞はアポトーシス様神経細胞死に

陥る。しかし、ミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) とともに B c l - x<sub>L</sub> 蛋白を培養神経細胞に強制発現しておく、同細胞の死がほぼ完全に抑止されることが報告されている (Saudou, F., et al., Cell, 95, 55-66, 1998)。従って脳神経組織における B c l - x<sub>L</sub> 蛋白発現増強作用を有するコウジン末を、舞踏病発病前あるいは発病後に経口投与すれば、効果・効能を示す可能性が高い。また舞踏病以外のポリグルタミン病 (Machado-Joseph病、dentatorubral-pallidoluysian atrophy等) でもコウジン末の経口投与が有効と思われる。

遺伝子診断によって舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を将来発症することが判明したヒト (体重 60 kg と仮定)、あるいはすでにポリグルタミン病を発症した患者 (体重 60 kg と仮定) に、コウジン末を 1 日あたり、2.0 g ~ 9.0 g、好ましくは 5.625 g ~ 3.6 g、より好ましくは 11.25 g ~ 18 g 経口投与する。舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病発症以前からコウジン末を経口投与するときは不幸にして疾病が発症しても、コウジン末の経口投与を病状が改善するかあるいは安定するまで継続することが望ましい。また、舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を発症した患者にコウジン末を経口投与する場合には、病状が改善するかあるいは病状が安定するまでコウジン末の経口投与を継続する。

#### 実施例 7 (コウジン末経口投与による拡張型心筋症の治療、予防及び処置)

拡張型心筋症は原因の不明な心筋細胞死 (心筋細胞変性) の結果、心機能の低下と心拡大を呈する疾患である。心機能低下は進行性に増悪し、心不全症状を発症し、死に至る。心不全が悪化したときには、心移植以外に治療法はないと考えられてきた。おそらく、拡張型心筋症患者の心筋細胞が死に至るときには、心筋細胞に豊富に含まれる細胞死抑制遺伝子産物 B c l - x<sub>L</sub> 蛋白が減少するものと推測されるので、この B c l - x<sub>L</sub> 蛋白の減少をコウジン末の経口投与によりくい止めることにより、同患者の心筋細胞死を先延ばしすることができ、ひいては同患者の心機能を長期にわたって維持することが可能になると思われる。

拡張型心筋症と診断された患者 (体重 60 kg と仮定) に対して、速やかにコウジン末を 1 日あたり、0.6 g ~ 1.5 g、好ましくは 1.5 g ~ 6 g、より好

ましくは2 g～4 g連日経口投与する。経口投与は、病状が改善するかあるいは病状の進行がとまるまで継続することが好ましい。また、コウジン末の経口投与と、 $\beta$ -ブロッカー、カルシウム拮抗剤、ACE阻害剤、アンギオテンシン受容体阻害薬等任意の循環系薬物の内服と併用することも可能である。

#### 実施例8（低用量ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与による脳浮腫の治療）

薬用人参（コウジン末）の経口投与実験の次に、本発明者は少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与で脳梗塞（脳塞栓）後の脳浮腫が改善するかどうかを調べた。

このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPLラット（体重250～300 g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6  $\mu$ g又は60  $\mu$ g）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6  $\mu$ g/日又は60  $\mu$ g/日）した。

なお、MCAを永久閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

MCA永久閉塞後32日目に、SH-SPLラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1 Mリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。

結果を第14図に示す。

第14図の上段が生理食塩水投与脳梗塞（脳塞栓）例8個体の脳を背側より撮影した実体顕微鏡写真である。第14図の下段がジンセノサイドRb<sub>1</sub>（6  $\mu$ g/日）静脈内投与脳梗塞（脳塞栓）例8個体の脳を背側より撮影した実体顕微鏡像である。脳の先端が写真の右側を向くように配列してあるので、黒くなった脳梗塞病変を有する左大脳半球は大脳縦裂の上側にみられる。大脳縦裂の下側にみられる正常の右大脳半球は、一部分のみ実体顕微鏡写真に含まれている。第14図の上段に示すごとく、生理食塩水投与脳梗塞例では、脳梗塞（脳塞栓）発症後32日目には、左大脳半球の黒く見える脳梗塞病巣が大きく拡大し、程度の差はあ

るもののすべての例において左大脳半球が右大脳半球より大きくなっている。特に上段の生理食塩水投与脳梗塞例のうち、1段目の右端の脳ならびに2段目の左から2番目の脳において、左大脳半球が右大脳半球より明らかに大きくなっている。このことは、MCAが永久閉塞した左大脳半球に脳浮腫が出現し、おそらく脳圧も亢進していることを物語っている。

一方、第14図の下段に示すごとくジンセノサイドRb<sub>1</sub> (6  $\mu$ g/日) 静脈内投与脳梗塞 (脳塞栓) 例では、全例において明らかに脳梗塞病巣が縮小しており、左大脳半球と右大脳半球の大きさにもほとんど差は認められない。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 静脈内持続投与により脳浮腫がみられなくなったのである。

#### 実施例9 (ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内持続投与による脊髄損傷治療)

脊髄損傷のモデルとして、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷されたウィスターラット (体重約300 g) を用いた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb<sub>1</sub> (12  $\mu$ g又は60  $\mu$ g) を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb<sub>1</sub> (12  $\mu$ g/日又は60  $\mu$ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (vehicle、媒体) を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのOpen field locomotor scores (Basso, Bettie and Bresnakan (BBB) scores) を計測して運動能力の指標とした (Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996)。ちなみに偽手術ラット (正常ラット) のBBB scores (BBBスコア) は20ないし21である。結果を第16図、第17図に示す。

第16図は脊髄損傷当日及び翌日の生理食塩水投与ラットならびにジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) 投与ラットを、それぞれ示している。第16図に示すごとく、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷されたラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷したのちに30分以上経過してからジンセノサイドRb<sub>1</sub> (60  $\mu$ g/日) を静脈内投与すると、

第16図に示すごとく1～2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。しかし、生理食塩水投与ラットの下肢対麻痺はまったく改善しない。

脊髄損傷後7日目のBBB scores (BBBスコア)にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第17図に示す。第17図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与の用量に依存して有意に改善した。データは平均値±標準誤差で示しており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

実施例10 (低用量の薬用人蔘粗サポニン分画の静脈内持続投与による脊髄損傷治療)

脊髄損傷のモデルとして、下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷されたウィスターラット (体重約300g) を用いた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈に粗サポニン分画 (870  $\mu$ g) の生理食塩水溶解液を単回注入し、さらに同静脈へ粗サポニン分画 (870  $\mu$ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照脊髄損傷動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (vehicle、媒体) を投与した。結果を第18図及び第19図に示す。第18図は粗サポニン分画投与例を、第19図は生理食塩水 (vehicle、媒体) 投与例を示す。

第18図に示すごとく、脊髄損傷を負荷した当日には、ラットは両下肢の対麻痺をきたし、粗サポニン分画を静脈内投与しても立ち上がることができないが、翌日より粗サポニン分画を静脈内投与したラットの下肢対麻痺が改善し始め、脊髄損傷後7日目には、オープンフィールドの外壁 (高さ8cm) をささえにして同ラットは立ち上がることが可能となった。一方、脊髄損傷負荷後に生理食塩水のみを投与したラットでは、第19図に示すごとく、脊髄損傷後1週間を経過してもまったく下肢対麻痺に改善はみられなかった。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、低用量の粗サポニン分画からなる静脈内持続投与製剤の脊髄損傷治療効果はジンセノサイドRb<sub>1</sub>と比べて遜色なく

らい優れたものと考えられる。

### 実施例 1 1 (ジンセノサイド R b<sub>1</sub> の静脈内持続投与による脊髄損傷ならびに褥創の治療)

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ウィスターラット（体重 300 g 程度）の下位胸髄に 20 g の圧力を 20 分間負荷した後にいったん覚醒せしめ、下肢対麻痺をきたしたラットをケージ内に 1 時間 40 分放置した。すなわちラットの下位胸髄に 20 g の圧力を加え始めた時点から、約 2 時間何の処置・治療も施さず脊髄損傷ラットを放置したことになる。その後速やかに左大腿静脈へジンセノサイド R b<sub>1</sub> (60 μg) を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイド R b<sub>1</sub> (60 μg / 日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて 7 日間持続投与した。対照の脊髄損傷動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (vehicle、媒体) を投与した。結果を第 2 1 図に示す。

第 2 1 図に示すごとく、下位胸髄への圧負荷を開始後 2 時間を経過した時点よりジンセノサイド R b<sub>1</sub> を静脈内投与されたラットは、脊髄損傷当日には下肢の対麻痺をきたしてまったく立ち上がることができず、翌日にもやや下肢対麻痺に改善はみられるものの依然として起立することができなかった。しかし同ラットは、脊髄損傷発症後 3 ~ 4 日目より徐々に下肢の対麻痺が回復し始め、第 2 1 図に示すごとく脊髄損傷後 1 週間目にはオープンフィールドの壁（高さ 8 cm）につかまりながら起立するようになった。一方、第 2 1 図に示すごとく、下位胸髄への圧負荷を開始後 2 時間を経過した時点より生理食塩水 (vehicle、媒体) のみを静脈内投与されたラットは、脊髄損傷後 1 週間を経過しても下肢の対麻痺はまったく改善しなかった。しかも、生理食塩水のみを静脈内投与された脊髄損傷ラットでは、個体により程度の差はあるものの、第 2 1 図に示すごとくしばしば下腹部に褥創が認められた。しかし、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> 静脈内投与例では下腹部の褥創はほとんどみられなかった。

### 実施例 1 2 (ジンセノサイド R b<sub>1</sub> によるオリゴデンドロサイト保護作用)

神経細胞とオリゴデンドロサイトを共培養して、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> が両細胞

の生存を促進するかどうかを調べた。このため、神経細胞は、妊娠17日のラット胎仔大腦皮質より分離した。オリゴデンドロサイトは、生直後ラットの前脳より開始した混合脳細胞培養より分離した。神経細胞50万個に対し、オリゴデンドロサイト5万個を共培養し、この培養系にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから10pg/mlの濃度で1%牛胎仔血清を含むDMEM中に添加し、5日間培養した。その後電気泳動サンプルを作成し、培養ウェル中の神経細胞特異タンパク質MAP2とオリゴデンドロサイト特異タンパク質のCNPaseの存在量をウェスタンブロットにより調べた。結果を第22図に示す。

第22図の上段がMAP2のウェスタンブロットを、第22図の下段がCNPaseのウェスタンブロットをそれぞれ示す。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから100fg/mlの濃度で、神経細胞とオリゴデンドロサイトの共培養系に添加すると、明らかにMAP2のバンドならびにCNPaseのバンドが、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>非添加例及びジンセノサイドRb<sub>1</sub> 10<sup>-4</sup>fg/ml添加例と比べて、明らかに濃くなっていた。このことは、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから100fg/mlの濃度で添加しておく、MAP2とCNPaseの存在量が明らかに多くなることを示している。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>により神経細胞ならびにオリゴデンドロサイトの生存が促進されたことになる。このことは、低濃度・低用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトの細胞死を伴う疾患（多発性硬化症、ピンスワンガー病、白質脳炎等の脱髄をきたす脳神経疾患）の予防・治療・処置に有効であることを強く支持するものである。

#### 実施例13（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>によるオリゴデンドロサイトにおけるBcl-x<sub>L</sub>発現増強）

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がオリゴデンドロサイトにおけるBcl-x<sub>L</sub>の発現を増強するかどうかを調べた。このため、たとえば一次培養ラットオリゴデンドロサイトにジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1fg/mlから10pg/mlの濃度で添加し、6時間培養した後に、総RNAを回収し、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAをRT-PCRにて測定した。RT-PCRの内部標準には、βアクチンmRNAを用いている。

また、一部のオリゴデンドロサイトはジンセノサイドRb<sub>1</sub>で処理後にSDS電気泳動サンプルとし、培養ウェル中の抗アポトーシス因子Bcl-x<sub>L</sub>の存在量をイムノブロット（ウェスタンブロット）により検討した。なお、オリゴデンドロサイトは、生直後ラット前脳より開始した混合脳細胞培養より分離した。結果を第23図に示す。第23図上段はRT-PCRの結果を、第23図の下段はイムノブロット（ウェスタンブロット）の結果をそれぞれ示す。Rb<sub>1</sub>（-）はジンセノサイドRb<sub>1</sub>不添加例、Rb<sub>1</sub>（+）はジンセノサイドRb<sub>1</sub> 100fg/ml添加例である。

RT-PCRにより、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を100fg/mlの濃度で添加しておくと、オリゴデンドロサイトにおいてBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現が明らかに増強した。また、イムノブロット（ウェスタンブロット）によって、Bcl-x<sub>L</sub>蛋白もジンセノサイドRb<sub>1</sub>の添加により増加することが判明した。本実験結果は、脊髄損傷や脱髄をきたす脳神経疾患において、少量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が、オリゴデンドロサイトの保護作用を発揮することを強く支持するものである。

#### 実施例14（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与によるBcl-x<sub>L</sub>発現増強）

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与した際に、脳組織においてBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現増加がみられるかどうかを調べた。

このため、たとえば12週齢のSH-SPラット（体重250～300g）を用いた。吸入麻酔下でSH-SPラットのMCAを永久閉塞した直後に、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>（60μg）を単回静脈内注入し、その後、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を60μg/日の用量で静脈内へ持続投与した。対照のMCA閉塞動物ならびに偽手術動物には、MCA永久閉塞後同量の生理食塩水（vehicle、媒体）のみを静脈内投与した。結果を第24図に示す。Group1（グループ1）は偽手術動物、生理食塩水投与MCA永久閉塞動物（MCA永久閉塞後すなわち脳梗塞後4時間目）、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与脳梗塞動物（MCA永久閉塞後4時間目）、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与脳梗塞動物（MCA永久閉塞後6時間目）の動物群を示す。Group2（グループ2）も同様の実験条件の動物で構成されている。Shamは偽

手術動物、Rb<sub>1</sub>(-)は生理食塩水投与脳梗塞動物、Rb<sub>1</sub>(+)はジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与脳梗塞動物を示す。偽手術後、ならびにMCA永久閉塞後4時間目もしくは6時間目に、ラットを抱水クロラルにて麻酔し左側大脳皮質(すなわちMCA永久閉塞側の大脳皮質)を取り出したのちに、総RNAを調整してRT-PCRに供した。なお内部標準として $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)のmRNAを用いた。

第24図に示すごとく、Group1、Group2ともに偽手術動物や生理食塩水投与脳梗塞動物に比べて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与例においてMCA永久閉塞後4時間目、6時間目ともに大脳皮質のBcl-x<sub>L</sub> mRNA発現が明らかに上昇していた。

実施例15(低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>による心筋細胞におけるBcl-x<sub>L</sub>発現増強)

さて、本発明者らはこれまで神経組織や神経組織構成細胞(神経細胞、オリゴデンドロサイト)を用いて、薬用人参(コウジン末)、粗サポニン分画、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果・効能を調べてきたが、次に心臓に対するジンセノサイドRb<sub>1</sub>の効果を検討した。このため、たとえば一次培養心筋細胞をジンセノサイドRb<sub>1</sub>存在下で18時間培養した際の、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAと、Bcl-x<sub>L</sub>タンパク質の発現変動をRT-PCRとイムノブロッティングにより検討した。心筋細胞は、妊娠17日齢のラット胎仔心臓をトリプシンEDTAを用いて細胞分散したものを、10%FCS(牛胎仔血清)を含有するDMEM中で数日間培養したものをを用いた。RT-PCRは、 $\beta$ アクチンmRNAを内部標準として用いた。イムノブロットでは、横紋筋特異的タンパク質であるトロポニンTを内部標準として、Bcl-x<sub>L</sub>タンパク質の発現を検討した。イムノブロットでは、異なるロットの心筋細胞を用いて、同様の実験を10回繰り返し、Bcl-x<sub>L</sub>免疫反応陽性のバンドをデンシトメトリーにて解析し、統計学的検討を行った。結果を第25図に示す。第25図の上段はRT-PCRの結果を、中段はイムノブロット(ウェスタンブロット)の結果を、下段はウェスタンブロットの結果をデンシトメトリー解析に供したものを、それぞれ示す。

第25図に示すごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 1 fg/ml ~ 100 fg/ml 存在時に、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現が明らかに上昇した。Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白レベルでは1 fg/ml から10<sup>4</sup> fg/ml の濃度域でジンセノサイドRb<sub>1</sub> が有意にBcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現を増強せしめた。本実験では、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 10<sup>4</sup> fg/ml の濃度でBcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現とBcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現に解離が生じているが、Bcl-x<sub>L</sub> mRNAの発現は、比較的高濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub> を投与した場合には、投与18時間後にはすでにダウンレギュレーションを受けるものと推測される。統計解析法はANOVA + Fisher's PLSDを用いた。

#### 実施例16（低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>による心筋細胞保護作用）

次に本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がBcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現を上昇せしめる濃度域で、実際に心筋細胞の細胞死を抑止できるかどうかを調べた。このために、たとえば一次培養心筋細胞を、グルコース非存在下で培養した際の、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の心筋細胞保護効果を検討した。グルコースを含有しない無血清DMEM中にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を0から1 ng/ml の濃度で添加しておき、心筋細胞を4ないし5日間培養した。その後電気泳動サンプルを作成し、抗横紋筋特異αアクチニン抗体を用いてイムノブロッティング（ウェスタンブロット）を行った。結果を第26図に示す。第26図の上段はα-アクチニン（α-Actinin）のウェスタンブロットの結果を、第26図の下段はウェスタンブロットの結果をデンストメトリー解析したものを、それぞれ示す。統計解析は、ANOVA + Scheffe's post hoc testによる。

第26図に示すごとく、無グルコース無血清培養液のみで培養した場合は、培養4~5日目にはすでに消失していた、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を1 fg/ml から10<sup>4</sup> fg/ml の濃度で添加しておいた場合には、拍動を続ける多数の心筋細胞が観察され、イムノブロットにより横紋筋特異的αアクチニンの有意な存在が認められた。以上の結果よりジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、神経細胞に対する場合よりもやや広い濃度域で（1~10<sup>4</sup> fg/ml）心筋細胞のBcl-x<sub>L</sub>発現を上昇せしめ、心筋細胞を保護する作用を有することが見出された。

実施例 17 (ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> の脳梗塞治療効果)

さて、本発明の先の出願（特願平 11-243378、薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤）において、本発明者らは薬用人参に含有される活性成分の候補物質をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を新規に検索できると記載したが、本発明においてこのことを実証することを試みた。そのために、たとえば、本発明の前記構造式 (II) で表されるジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> (dihydro-ginsenoside R b<sub>1</sub>) を用いた。ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> は本発明者らの知る限り、新規化合物であると考えられるが、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> を還元することにより製造することができる。

以下にジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> の製造例ならびに NMR のデータを示す。

10% Pd/c 10, 2 mg を秤量し、活セン付 2 口フラスコに入れる。メタノール（特級）を 1 ml 加えて懸濁させる。水素風船（約 1.1 気圧）をとりつけ 30 分 0℃ で触媒を活性化する。ジンセノサイド R b<sub>1</sub> 19.9 mg をメタノール 1 ml で溶かし注射器で注入する。混合物を 10 時間半 0℃ で激しく攪拌する（磁気スターラー）。反応混合物をろ紙及び 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過する。メタノールを減圧除去する。純水 10 ml に溶解させたのち凍結乾燥すると 19.1 mg（収率 97%）のジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> を白色粉末として得た。融点は 193-195℃ である。ちなみに、ジンセノサイド R b<sub>1</sub> の融点は 197-198℃（文献値）である。

第 29 図に NMR チャート（400 MHz, CD<sub>3</sub>OD）を示す。

約 16 週齢の雄性 SH-S P ラット（体重 300~320 g）を使用した。同動物は 12 時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> を MCA 永久閉塞直後に単回静脈内注入し（約 6 μg）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて 24 時間静脈内へ持続注入（約 6 μg/日）した。

なお、MCA を永久閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）には同量の生理食塩水（vehicle、媒体）のみを静脈内投与した。MCA 永久閉塞後 24 時間目

に、致死量のペントバルビタールをラットの腹腔内に注入した。同動物が死亡した直後に脳を摘出し、2 mmの厚みの前額切片を作成した。同切片を、1 %の塩化2, 3, 5-トリフェニル-テトラゾリウム (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC)) 溶液に30分間37℃で浸漬し、10 %ホルマリンにて12時間以上固定した。結果を、第27図、第28図に示す。第27図は生理食塩水を投与した2例を、第28図はジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内投与した2例を示す。

第27図に示すごとく、MCA永久閉塞後生理食塩水を投与したラットでは、向かって左側の大脳皮質に、TTCで染色されない白色の脳梗塞病巣が明らかに認められた。一方、第28図に示すごとく、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞後に静脈内投与したラットでは脳梗塞病巣が顕著に縮小していた。この効果は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳梗塞縮小作用に匹敵すると考えられた。

#### 実施例18 (ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>による褥創の予防・治療・処置)

寝たきり患者ならびに高齢者の褥創は、全身状態を悪化させるきっかけともなりQOL (生活の質、quality of life) を著しく損なう皮膚疾患である。褥創の早期には病変部皮膚の発赤がみられるが、この時点で病変部局所ならびにその周辺に塗布して効果・効能を示す外用剤もしくは静脈内投与製剤がほとんどないことが、皮膚科領域で大きな問題となっている。もちろん、皮膚組織が欠損した褥創病変の治療も困難を究めることが多々ある。

ブドウ糖を含有するか含有しない任意の水溶性基剤あるいは脂溶性基剤にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を混入して皮膚外用剤 (クリームまたは軟膏) を作成し、褥創部局所及びその周辺部に褥創病変が治癒するか縮小するかあるいは悪化しなくなるまで、常時塗布する。その際に局部におけるジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の細胞外液濃度が100 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となるように基剤へのジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>混入量を調整する。また、必要に応じて、本実施例4ならびに本実施例5に記載された要領でジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与を併用する。

#### 実施例19 (ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>による角膜損傷の予防・治療・処置)

コンタクトレンズ装着あるいはエキシマレーザーによる近視矯正術後に角膜損傷が生じることがよく知られているが、実際に角膜組織を保護する点眼薬はほとんどないのが現状である。

各種点眼用基液もしくは基剤にジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> を混入して点眼薬もしくは眼軟膏を作成し、角膜損傷患者に連日必要回数点眼し、角膜病変が改善するまであるいは治癒するまで点眼を継続する。その際に角膜病変組織におけるジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> の細胞外液濃度が 100 ng/ml 以下、好ましくは 10 pg/ml 以下、より好ましくは 100 fg/ml 以下となるように基液へのジンセノサイド R b<sub>1</sub> 混入量を調整する。もちろん、ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> の代わりにジンセノサイド R b<sub>1</sub> を用いてもよい。

#### 実施例 20 (ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> による移植用角膜の保護)

角膜移植は、移植医療の中でももっとも成功率の高い治療法として眼科領域では頻繁に実施されている。しかし、御遺体から角膜を採取したのち移植手術を実施するまでの間にも移植用角膜組織を構成する細胞は確実に死に至り始めるため、このことが角膜採取から移植手術までの時間を制約する最大の要因となっている。

移植用角膜を採取後、従来の角膜保存液の中にジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> を 100 ng/ml 以下、好ましくは 10 pg/ml 以下、さらに好ましくは 100 fg/ml 以下となるように混入して移植用角膜を保護することができる。

#### 実施例 21 (ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub> による舞踏病の予防・治療・処置)

舞踏病 (ハンチントン病) は神経変性疾患の中でも代表的な単一遺伝子病として知られており、ポリグルタミンをコードする CAG のくり返し配列が病因であると考えられているが、その治療法はいまだ開発されていない。舞踏病の責任遺伝子であるミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) を線状体由来の培養神経細胞に導入 (transfection) すると、同細胞はアポトーシス様神経細胞死に陥る。しかし、ミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) とともに Bcl-2 を培養神経細胞に強制発現しておくと、同細胞の死がほぼ完全に抑止されることが報告されている (Saudou, F., et al., Cell, 95, 55-66, 1998)。従って、

脳神経組織における Bcl-xL 発現増強作用を有すると考えられるジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を、舞踏病発病前あるいは発病後に点鼻、挿肛もしくは静脈内投与すれば、効果・効能を示す可能性が高い。また舞踏病以外のポリグルタミン病 (Machado-Joseph 病、dentatorubral-pallidoluysian atrophy 等) でもジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の点鼻投与、挿肛投与もしくは静脈内投与が有効と思われる。さらに、ジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> はジンセノサイド Rb<sub>1</sub> と同様に舞踏病の一次病変 (線状体病変) から、線状体と線維連絡を有する他の脳領域へ二次変性が進展することも阻止すると期待される。

遺伝子診断によって舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を将来発症することが判明したヒト (体重 60 kg と仮定)、あるいはすでに舞踏病もしくはその他のポリグルタミン病を発症した患者 (体重 60 kg と仮定) に、ジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を適量病状が改善するかあるいは安定するまで点鼻投与、挿肛投与もしくは静脈内投与する。また、ポリグルタミン病治療のためのジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 静脈内投与量は急性期脳卒中治療に要する投与量と同様もしくはそれより 5 ~ 10 倍多い量とする。点鼻投与もしくは挿肛投与については、静脈内投与されたジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> と同様の血中濃度が維持できるように、投与量を調整すればよい。

## 実施例 22 (ジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> による拡張型心筋症の予防・治療・処置)

拡張型心筋症は原因の不明な心筋細胞死 (心筋細胞変性) の結果、心機能の低下と心拡大を呈する疾患である。心機能低下は進行性に増悪し、心不全症状を発症し、死に至る。心不全が悪化したときには、心移植以外に治療法はないと考えられてきた。おそらく、拡張型心筋症患者の心筋細胞が死に至るときには、心筋細胞に豊富に含まれる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL 蛋白が減少するものと推測されるので、この Bcl-xL 蛋白の減少をジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内投与、挿肛投与もしくは点鼻投与によりくい止めることにより、同患者の心筋細胞死を先延ばしすることができ、ひいては同患者の心機能を長期にわたって維持することが可能になるとと思われる。

拡張型心筋症と診断された患者（体重 60 kg と仮定）に対して、速やかにジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を適当量病状が改善するかあるいは病状の進行が止まるまで点鼻、挿肛もしくは静脈内投与する。また、ジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の投与と、β-ブロッカー、カルシウム拮抗剤、ACE 阻害剤等の内服とを併用することも可能である。心疾患を始めとする末梢臓器・組織の疾病に対して、ジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を投与するときは、中枢神経疾患に対する投与量と同等もしくはそれより 1/10 から 1/10000 程度少ない投与量を選択することが好ましい。

### 実施例 23（化粧品組成物としてのジンセノサイド Rb<sub>1</sub> による皮膚の老化防止）

加齢に伴う皮膚の老化は主として紫外線照射によりもたらされ、皮膚の萎縮、たるみ、白髪、角層剥離、角質細胞剥離、ふけ、皮脂欠乏、亀裂、かゆみ、かさつき、ひびわれ、しみ、しわ、そばかす、色素沈着、日焼け、乾燥等の症状を呈する。ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は患部組織の細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下、好ましくは 10 pg/ml 以下、より好ましくは 100 fg/ml 以下で、表皮細胞、皮脂腺の細胞、毛包の細胞、汗腺の細胞、線維芽細胞、幹細胞、間葉系細胞、脂肪細胞等を含めた皮膚の細胞を保護する作用を発揮するので、あらゆる化粧品、たとえば化粧水（スキンローション）、乳液（ミルクローション）、ファンデーション、コールドクリーム、クレンジングクリーム、洗顔フォーム、ナイトクリーム、美白クリーム、おしろい、口紅、リップクリーム、下地クリーム（メイクアップベース）、うがい薬、洗眼液、洗顔液、UV リキッドファンデーション、パウダーファンデーション等にジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を微量混入して皮膚局所における細胞外液濃度を前記のごとく低濃度に維持すれば皮膚の老化症状に対して優れた効果を発揮すると考えられる。

液状の化粧品、たとえば通常の UV リキッドファンデーションにジンセノサイド Rb<sub>1</sub> を混入するときは、その濃度が 1000 ng/ml 以下、好ましくは 10 ng/ml 以下、より好ましくは 10 fg/ml ~ 100 pg/ml 以下となるように調整した上で、連日皮膚に外用塗布もしくは外用噴霧すれば皮膚局所におけるジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の細胞外液濃度が前記のごとく、低く維持され、皮膚の

老化症状（皮膚の萎縮、白髪、ふけ、角層剥離、角質細胞剥離、皮脂欠乏、易感染性、たるみ、かゆみ、かさつき、ひびわれ、乾燥、しみ、しわ、そばかす、色素沈着、日焼け）の改善、進行予防もしくは悪化予防に役立つ。また、固形やゲル状の化粧品たとえば、通常の下地クリームやナイトクリームにジンセノサイド R b<sub>1</sub>を混入するときも、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>の混入量をクリーム 1 g あたり 1 0 0 0 n g 以下、好ましくは 1 0 n g 以下、より好ましくは 1 0 f g ~ 1 0 0 p g 程度にして、連日皮膚に外用塗布すれば、皮膚の老化症状（萎縮、たるみ、かゆみ、かさつき、ひびわれ、乾燥、しみ、しわ、そばかす、色素沈着、日焼け等）の予防、治療、処置に役立つ。ジンセノサイド R b<sub>1</sub>を皮膚の老化症状の予防、改善、処置の目的で上記の化粧品に混入する際の濃度の上限は、液状化粧品の場合、1 0 μ g / m l 未満、固形もしくはゲル状の化粧品の場合は 1 0 μ g / g 未満である。すなわち、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>は 0 . 0 0 1 % 未満の濃度で上記の化粧品に混入しなければならない。さもないと、かえって皮膚の細胞の膜を障害することにもなりかねない。もちろん、上記のごとくジンセノサイド R b<sub>1</sub>を微量含有する化粧品は、顔面に外用塗布、外用噴霧するのみならず、日光に頻繁に照射されるその他の皮膚組織（たとえば四肢や体幹）に外用塗布もしくは外用噴霧できる。このように、低濃度のジンセノサイド R b<sub>1</sub>を含有する化粧品もしくは皮膚外用剤を長期にわたって常時使用することにより、皮膚の老化に伴う症状を予防もしくは改善することができる。

また、ジンセノサイド R b<sub>1</sub>のかわりに、ほぼ同じ量のジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub>や薬用人蔘粗サポニン分画及びその成分を化粧品や皮膚外用剤に混入しても皮膚の老化に伴う諸症状を防ぐことができる。ジンセノサイド R b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub>もしくは薬用人蔘のエキス又は粗サポニン分画及びその成分は、前述のごとく低濃度のものを用いる限り、既製のあらゆる化粧品や皮膚外用剤に混入することができる。もちろん、任意の有効成分を含有する化粧品の基剤を新規に開発する場合にも、その中にジンセノサイド R b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイド R b<sub>1</sub>、薬用人蔘のエキス又は粗サポニン分画、薬用人蔘の粗サポニン分画の成分のいずれかを前述のごとく低濃度で混入することにより皮膚の老化による諸症状を予防、処置、改善することができる。また、前述のごとく低濃度のジンセノサ

イドR b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>、薬用人蔘のエキス又は粗サポニン分画、薬用人蔘の粗サポニン分画の成分のいずれかを、複数組み合わせることで既製の化粧品や皮膚外用剤に混入するか、もしくは任意の有効成分を含有する新規の化粧品の基剤に混入することにより、皮膚の老化による諸症状を予防、処置、改善するための化粧品や皮膚外用剤を作成できる。ジンセノサイドR b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>、薬用人蔘のエキス又は粗サポニン分画、薬用人蔘の粗サポニン分画の成分のいずれかを、複数組み合わせることで化粧品や皮膚外用剤に混入するときは、化粧品や皮膚外用剤におけるそれぞれの濃度が前述のごとく低濃度である限り、任意の濃度のものが選択できる。また、薬用人蔘成分以外の公知の化粧品組成物を皮膚の老化防止用の化粧品に混入するときも、従来報告された濃度より低くすることが好ましい。

さらに、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>、薬用人蔘のエキス又は粗サポニン分画、薬用人蔘の粗サポニン分画の成分のいずれかは、既製の発毛・育毛剤や任意の有効成分を含有する新規の発毛・育毛剤に、化粧品の場合と同様の方法で低濃度で混入することにより、発毛、育毛、脱毛の悪化予防、脱毛の進行予防のために使用することができる。また、化粧品、発毛剤もしくは育毛剤に混入する薬用人蔘の粗サポニン分画のかわりに、およそ5～6倍量以下の薬用人蔘抽出物（エキス）を使用してもよい。もちろん低濃度のものを使用する限り、薬用人蔘の粗サポニン分画と薬用人蔘エキスを併用して、前述の化粧品もしくは発毛剤、育毛剤、脱毛の進行予防剤に混入してもよい。さらに、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその他の薬用人蔘成分を含有する任意の天然物や天然物の組成物をあらゆる化粧品、発毛剤、育毛剤又は脱毛進行予防剤に混入して、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>もしくはその他の薬用人蔘成分の最終的な含有量が前述のごとく低濃度に維持できるのであれば皮膚の老化症状や脱毛の改善、予防又は処置のために利用できる。また薬用人蔘エキス、粗サポニン分画、粗サポニン分画構成成分、ジンセノサイドR b<sub>1</sub>、ジヒドロジンセノサイドR b<sub>1</sub>及びそれらの化学的誘導体はケミカルピーリングにも利用できる。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、細胞保護剤などとして有用な薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物に関する。より詳細には、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、アポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞保護のための医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脳浮腫、脳神経組織の浮腫、もしくは脊髄組織の浮腫を予防、治療、処置するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脊髄損傷に伴う褥創を予防、治療、処置するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織の細胞死抑止遺伝子 Bcl-x<sub>L</sub> 発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進させるための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの保護剤、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x<sub>L</sub> の発現を促進するための医薬組成物、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物、に関する。

さらに、本発明は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤、より詳細には、低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤に関する。

また、本発明は、前記疾患や病変の予防、処置又は治療のための有効成分、又は脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘成分又はその代謝産物の使用に関する。

また、本発明は、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> をリード化合物として作成できる新規化学的誘導体、すなわち細胞保護剤として有用なジヒドロジンセノサイド Rb<sub>1</sub> にも

関する。さらに、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳梗塞もしくは脳卒中の予防、治療、処置のための医薬組成物もしくは神経細胞の壊死（ネクローシス）、アポトーシス又はアポトーシス様神経細胞死を抑止するための医薬組成物に関する。また、ジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物、すなわち低濃度、低用量の静脈内持続投与用製剤もしくは単回静脈内注入製剤である医薬組成物に関する。

## 請 求 の 範 囲

1. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させるための医薬組成物。
2. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。
3. 薬用人参のエキスが薬用人参の抽出物である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の医薬組成物。
4. 薬用人参もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の医薬組成物。
5. 薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人参の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の医薬組成物。
6. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させる組織が脳神経組織もしくは脊髄組織である請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させる組織が肝臓又は脾臓である請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。
8. 細胞が、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞である請求の範囲第 2 項～第 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。
9. 細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす疾患の治療、予防、又は処置のための請求の範囲第 2 項～第 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。
10. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。
11. 脳・神経疾患が脳血管性痴呆、脳梗塞又は脳卒中である請求の範囲第 10 項に記載の医薬組成物。

12. 経口投与用製剤である請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の医薬組成物。

13. 哺乳動物に対する投与量が1日あたり $1/6 \sim 1/2$  g/kgである請求の範囲第12項に記載の医薬組成物。

14. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の医薬組成物。

15. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第14項に記載の医薬組成物。

16. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $14.5 \text{ ng/ml}$ 以下となるように調整されている請求の範囲第12項～第15項のいずれかに記載の医薬組成物。

17. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 1450 \text{ fg/ml}$ もしくは $1 \sim 145000 \text{ fg/ml}$ である請求の範囲第35項に記載の静脈内投与用製剤。

18. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。

19. 薬用人参のエキスが薬用人参の抽出物である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。

20. 薬用人参もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。

21. 薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人参の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。

22. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が $14.5 \text{ ng/ml}$ 以下となる請求の範囲第18項又は第21項に記載の医薬組成物。

23. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の濃度が1～1450fg/mlもしくは1～145000fg/mlである請求の範囲第22項に記載の医薬組成物。

24. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第18項～第23項のいずれかに記載の医薬組成物。

25. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第24項に記載の医薬組成物。

26. 脳・神経疾患が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

27. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第26項に記載の医薬組成物。

28. 上肢もしくは下肢の麻痺を改善させることによるものである請求の範囲第26項又は第27項に記載の医薬組成物。

29. 排尿障害もしくは排便障害を改善させることによるものである請求の範囲第26項又は第27項に記載の医薬組成物。

30. 神経因性膀胱を改善させることによるものである請求の範囲第26項又は第27項に記載の医薬組成物。

31. 脳・神経疾患が神経組織の二次変性である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

32. 脳・神経疾患が神経組織又は脊髄組織の外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

33. 外傷が、脊髄損傷、神経外傷もしくは頭部外傷である請求の範囲第32項に記載の医薬組成物。

34. 脳・神経疾患がオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

35. オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第34項に記載の医薬組成物。

36. 脳・神経疾患が脱髄である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記

載の医薬組成物。

37. 脳・神経疾患が脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

38. 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第37項に記載の医薬組成物。

39. 脳・神経疾患が、脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

40. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。

41. 心臓疾患が心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第40項に記載の医薬組成物。

42. 薬用人参のサポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイドRb<sub>1</sub>である請求の範囲第5項又は第21項に記載の医薬組成物。

43. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる静脈内投与用製剤。

44. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の濃度が低濃度である請求の範囲第43項に記載の静脈内投与用製剤。

45. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が1 ng/ml以下となるように調整されている請求の範囲第44項に記載の静脈内投与用製剤。

46. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が1～100 fg/mlもしくは1～10000 fg/mlである請求の範囲第45項に記載の静脈内投与用製剤。

47. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第43項～第46

項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。

48. 脳・神経疾患が、脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第47項に記載の静脈内投与用製剤。

49. 心臓疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第43項～第46項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。

50. 心臓疾患が、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第49項に記載の静脈内投与用製剤。

51. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与製剤である請求の範囲第43項～第50項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。

52. 請求の範囲第43項～第51項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤からなる脳細胞、神経細胞又は心筋細胞の保護剤。

53. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物。

54. 生体組織の浮腫が脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第53項に記載の医薬組成物。

55. 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第54項に記載の医薬組成物。

56. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物。

57. 褥創が脊髄損傷によるものである請求の範囲第56項に記載の医薬組成物。

58. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物。

59. 神経麻痺が脊髄損傷後の上肢または下肢の対麻痺である請求の範囲第58項に記載の医薬組成物。

60. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物。

61. 排尿障害もしくは排便障害が脊髄損傷によるものである請求の範囲第60

項に記載の医薬組成物。

62. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物。

63. 神経因性膀胱が脊髄損傷によるものである請求の範囲第62項に記載の医薬組成物。

64. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進させるための医薬組成物。

65. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイト保護剤。

66. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物。

67. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現を促進するための医薬組成物。

68. 心筋細胞の細胞死を伴う疾患の予防・治療又は処置のための請求の範囲第66項又は第67項に記載の医薬組成物。

69. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞保護剤。

70. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が1 ng/ml以下または約0.9 nM以下となる請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

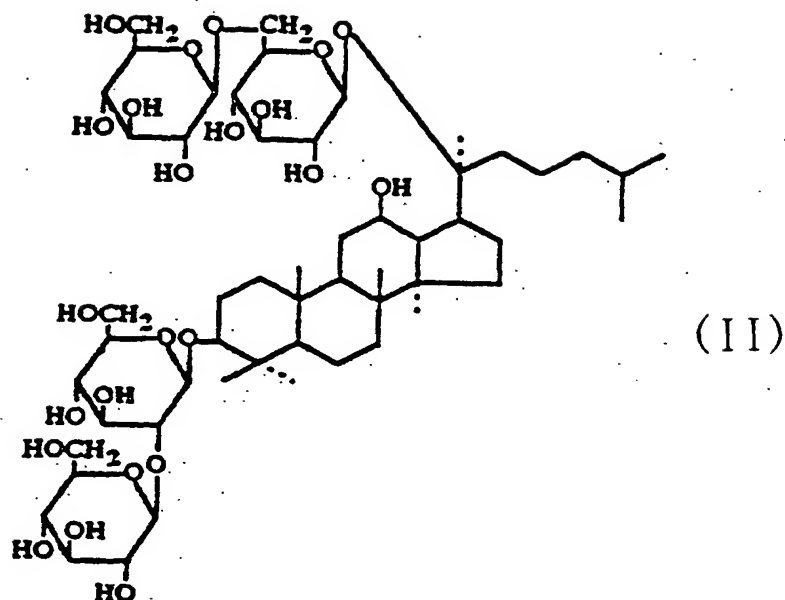
71. ジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代謝産物又はそれらの塩のその濃度が1～100 fg/ml（約0.9～90 fM）または1～10<sup>4</sup> fg/ml（約0.9～9000 fM）である請求の範囲第70項に記載の医薬組成物。

72. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

73. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

74. 下記構造式(II)で示されるジヒドロジンセノサイドRb<sub>1</sub>もしくはその代

謝産物又はそれらの塩。



75. 細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止するための請求の範囲第74項に記載の化合物もしくはその代謝物又はそれらの塩を含有してなる医薬組成物。

76. 細胞が、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の脳細胞又は神経細胞である請求の範囲第75項に記載の医薬組成物。

77. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための、請求の範囲第74項に記載の化合物もしくはその代謝物又はそれらの塩を含有してなる医薬組成物。

78. 脳・神経疾患が、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第77項に記載の医薬組成物。

79. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第75項～第78項のいずれかに記載の医薬組成物。

80. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第79項に記載の医薬組成物。

81. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物

又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法。

82. 薬用人蔘のサポニン分画含有成分のいずれかがジンセノサイド Rb<sub>1</sub>である請求の範囲第81項に記載の方法。

83. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患もしくは脳梗塞である請求の範囲第81項又は第82項に記載の方法。

84. 請求の範囲第81項～第83項のいずれかに記載の方法により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤。

85. 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用。

86. 神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人蔘サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用。

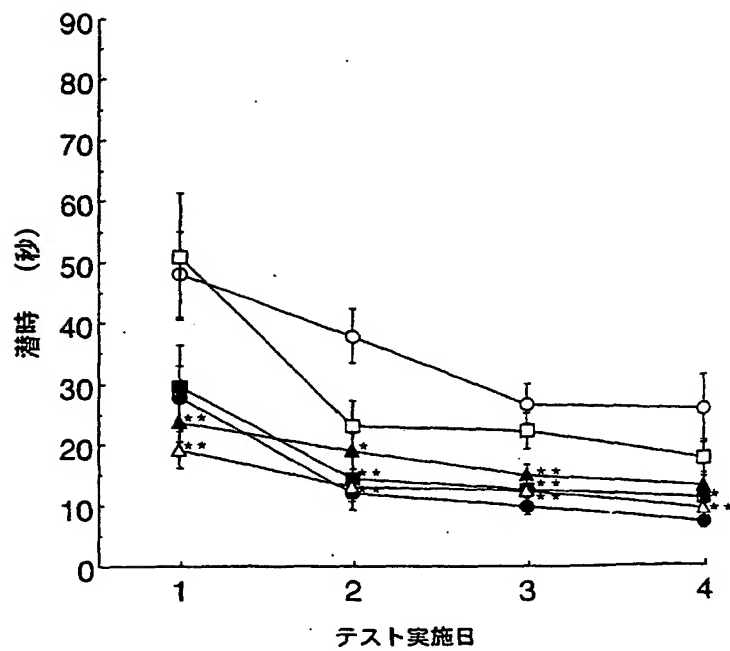
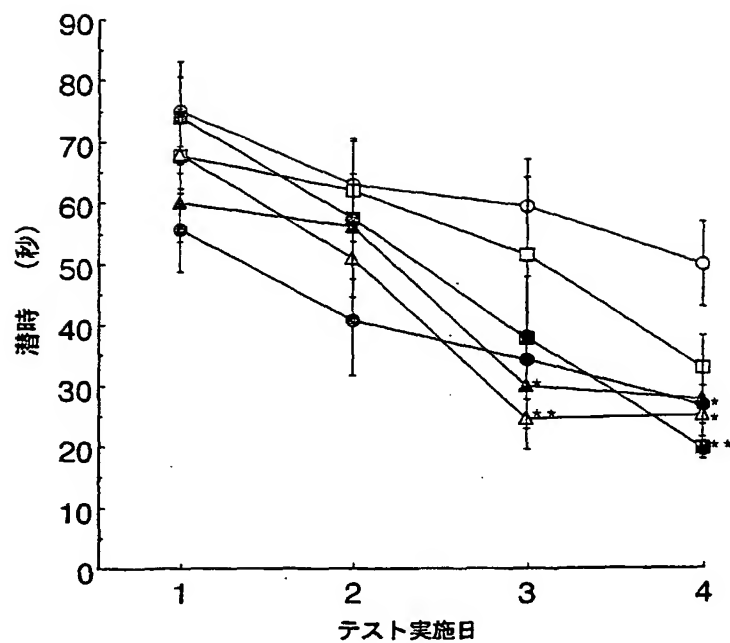
87. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するための薬用人蔘サポニン分画構成成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用。

88. 薬用人蔘に含有される成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法。

89. 脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索するために薬用人蔘に含有される成分のリード化合物としての使用。



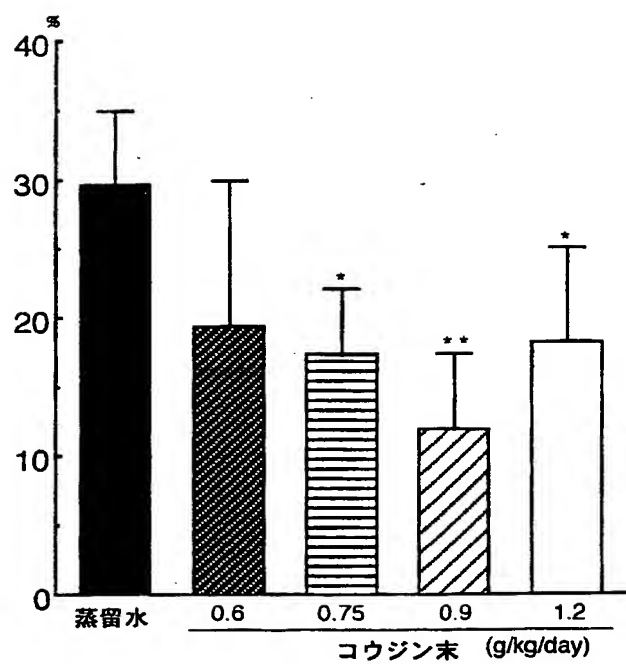
第 1 図



\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$



## 第 2 図

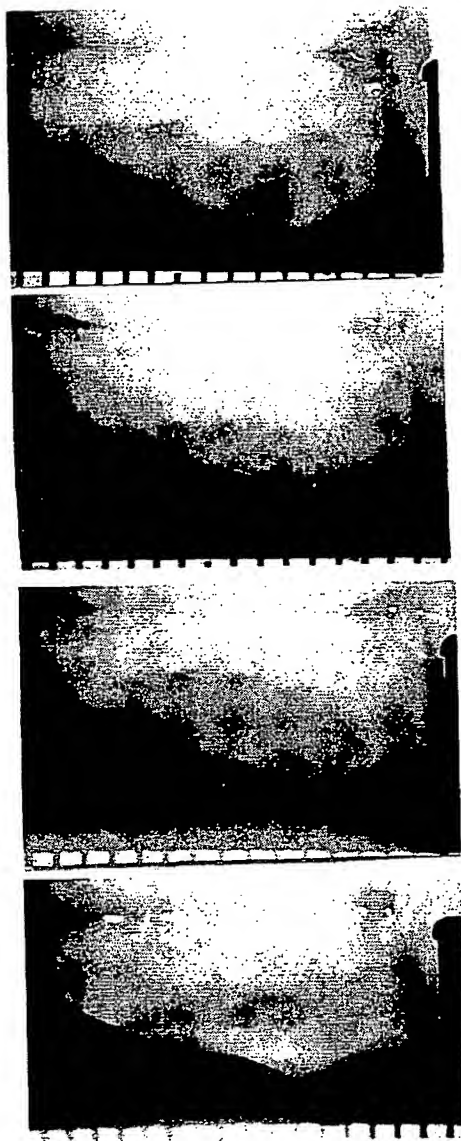


\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

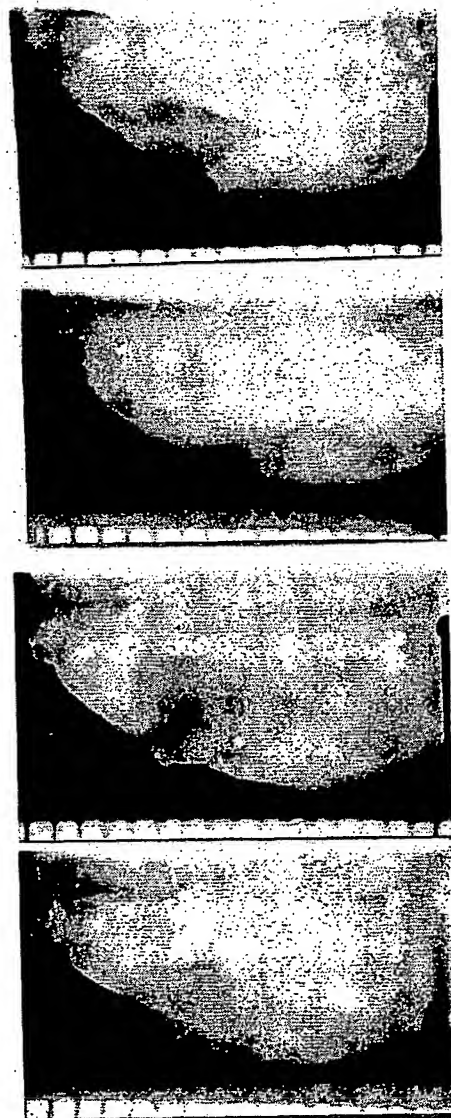


第 3 図

蒸留水投与虚血群

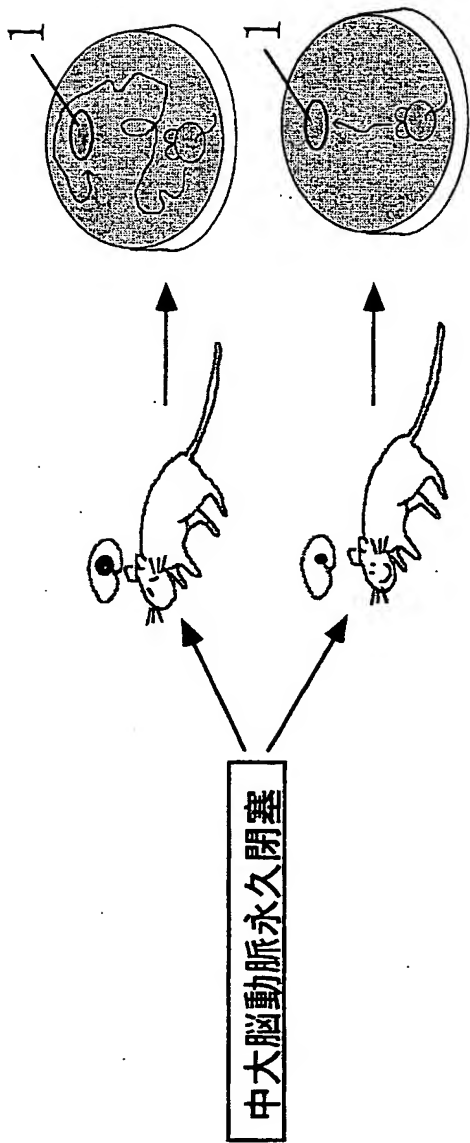


コウジン末投与虚血群



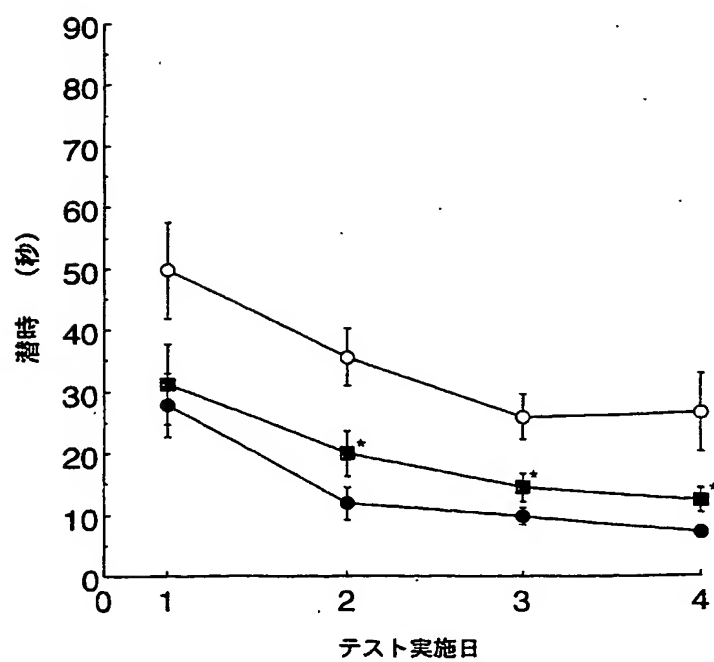
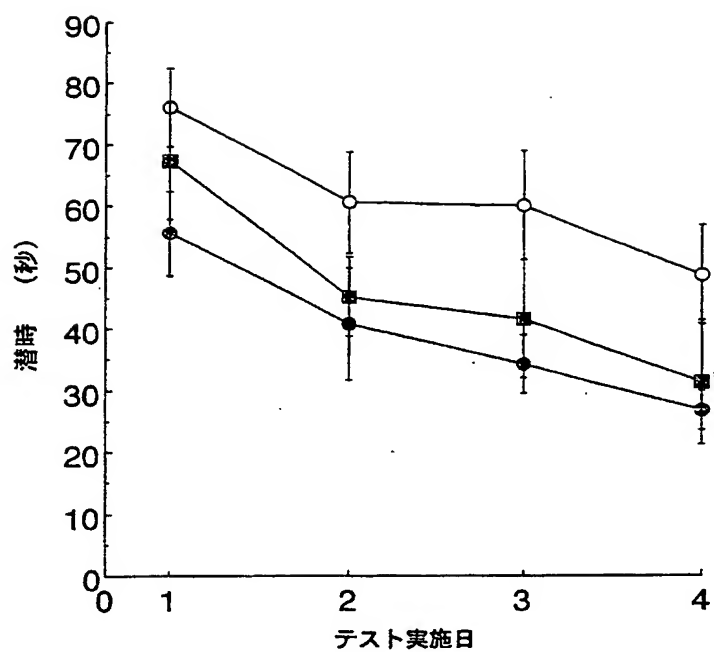


第 4 図



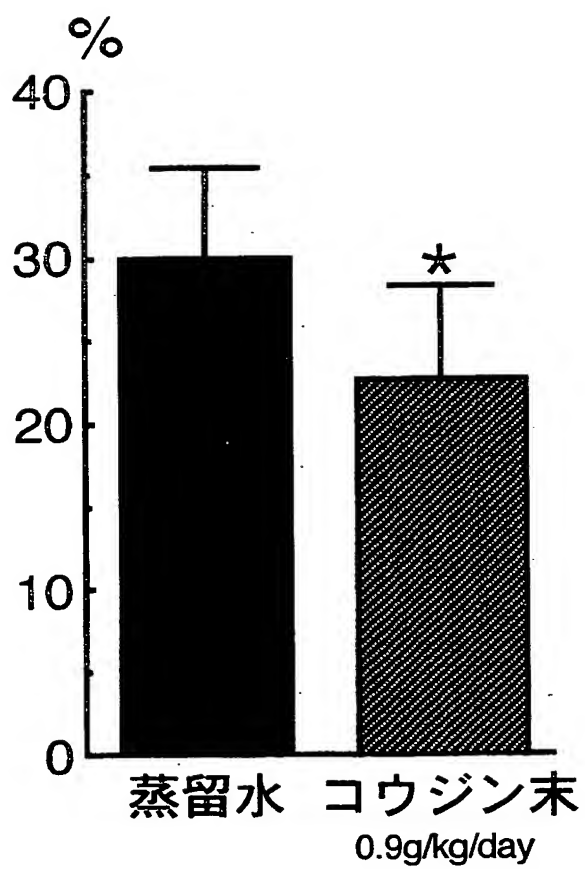


第 5 図

\*  $P < 0.05$



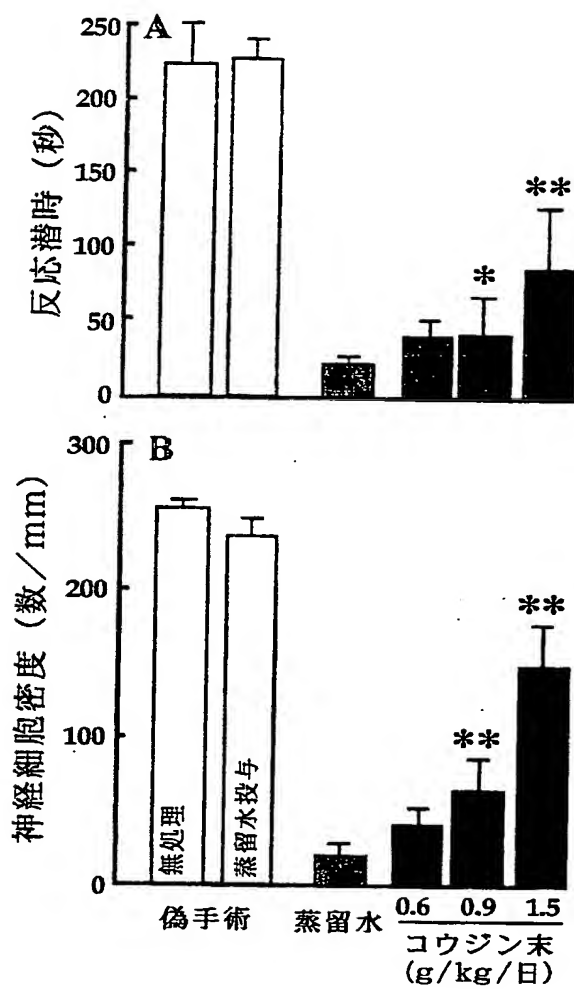
## 第 6 図



\*  $P < 0.05$



第 7 図



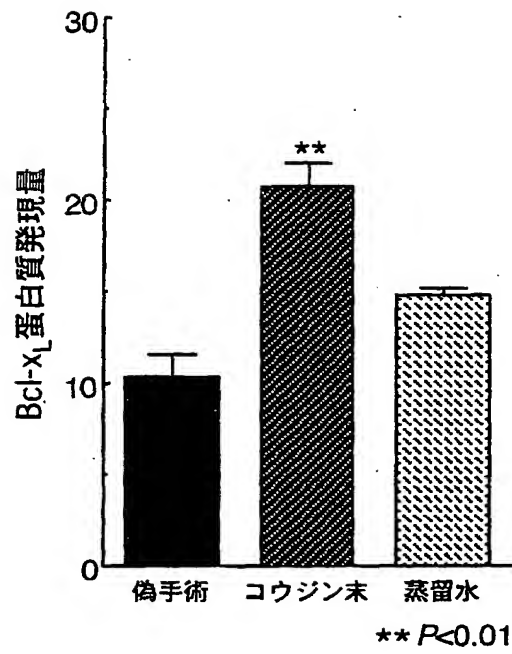


第 8 図





## 第 9 図

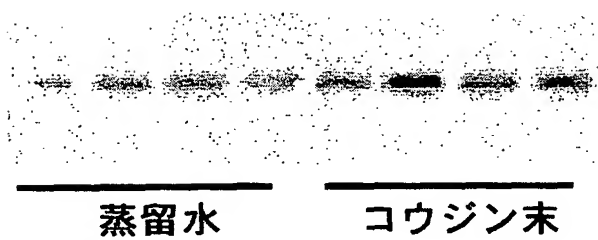


N=4

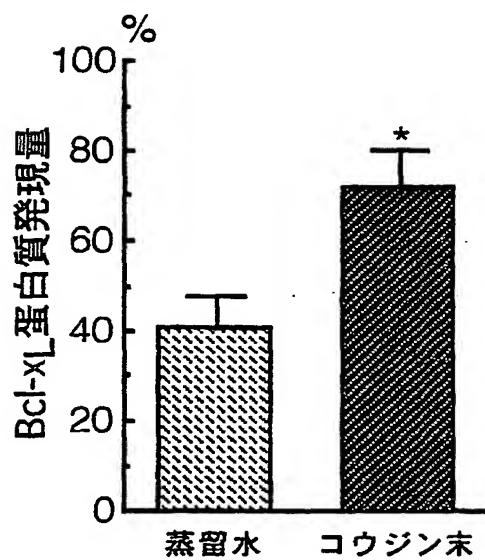


## 第 10 図

A

Bcl-x<sub>L</sub> protein

B



\* P&lt;0.05 N=4



## 第 11 図

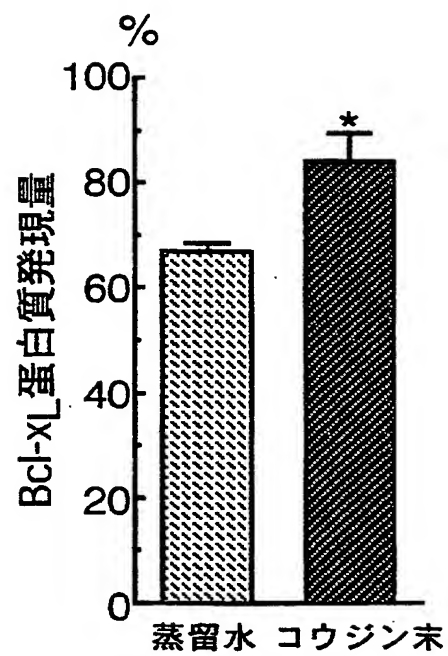
A

Bcl-x<sub>L</sub> protein

蒸留水

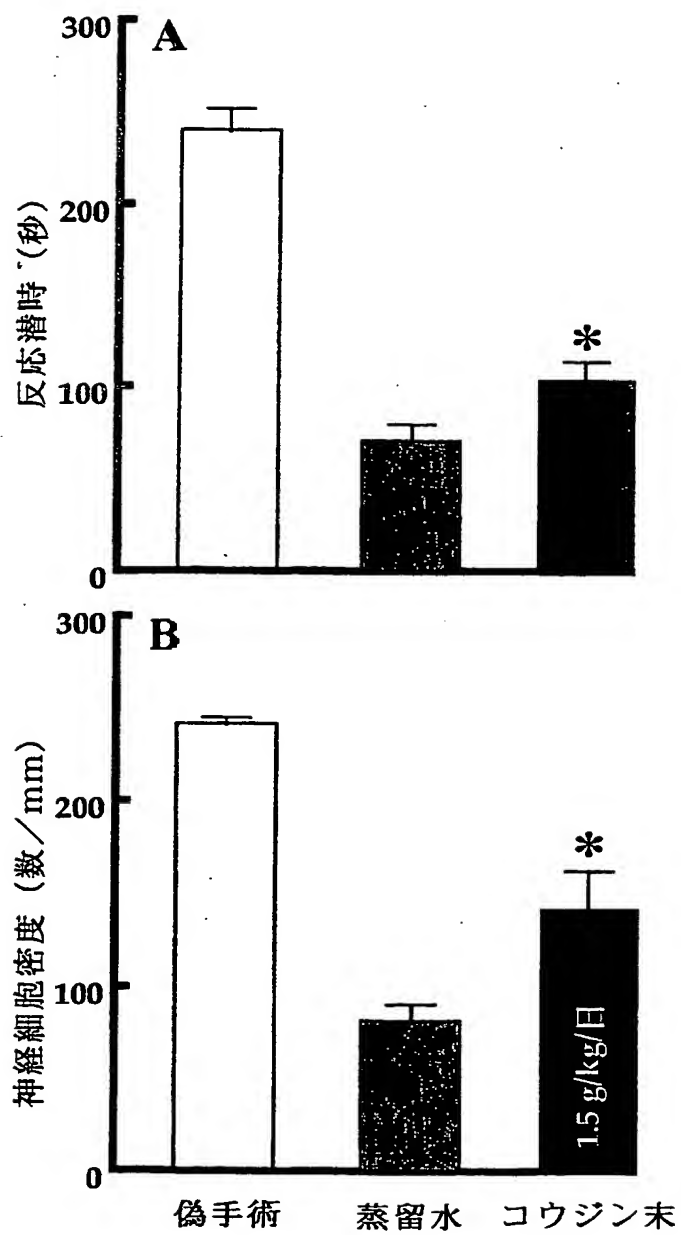
コウジン末

B

\*  $P < 0.05$  N=4

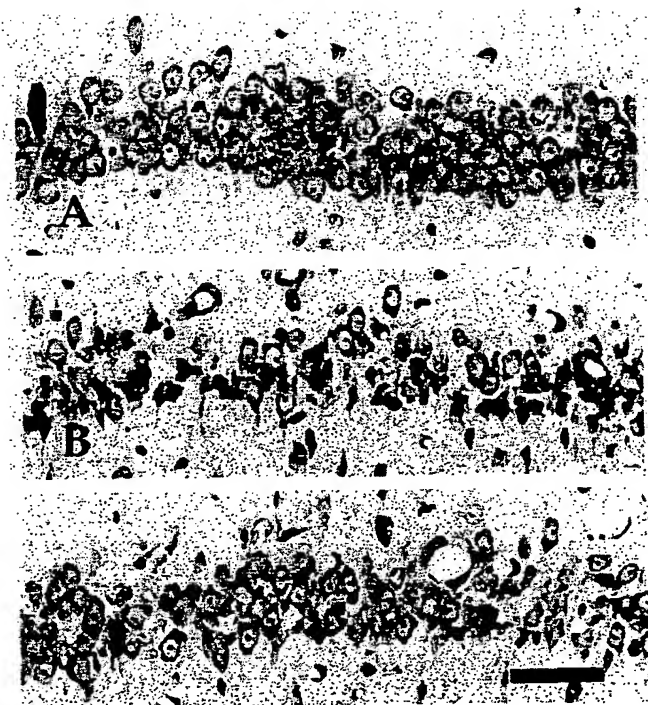


## 第 1 2 図





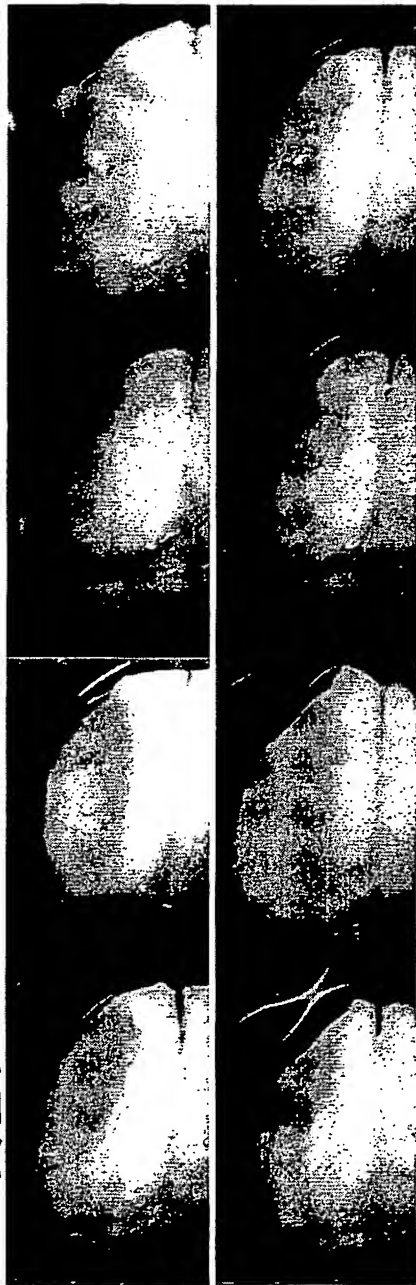
第 1 3 図



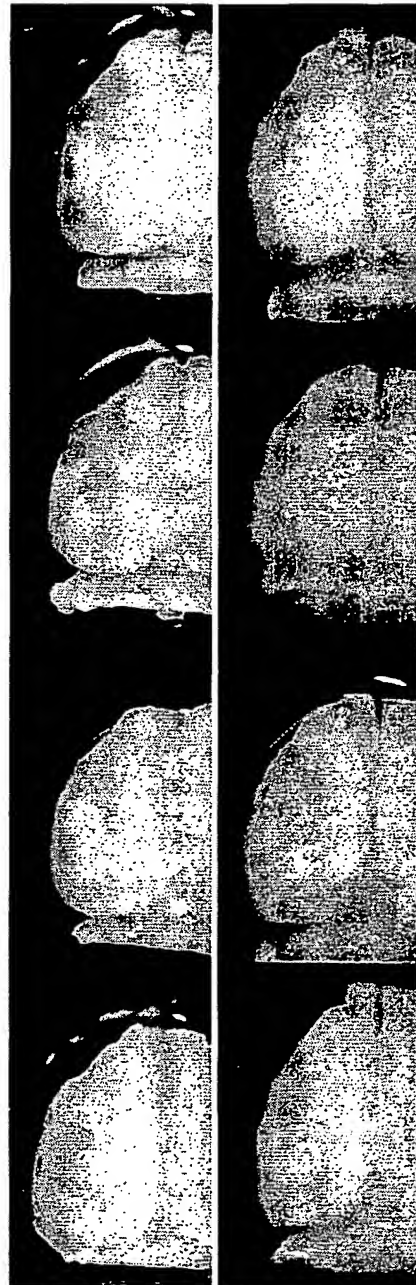


第 1 4 図

生理食塩水



Rb1 6  $\mu$ g/day





## 第 15 図

